

(11) 1990年11月10日

(43)公開日 平成8年(1996)7月30日

審査請求 未請求 請求項の数27 FD (全18頁) 最終頁に続く

(71)出願人 0 0 0 1 5 5 9 0 8
株式会社林原生物化学研究所
岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(72)発明者 牛尾 真平
岡山県岡山市福成1丁目166番6号

(72)発明者 鳥越 角二
岡山県倉敷市藤戸町藤戸1343番地の5

(72)発明者 谷本 忠雄
岡山県岡山市山崎312番地の8

(72)発明者 岡村 春樹
大阪府茨木市中穂積2丁目12番32号

(72)発明者 栗本 雅司
岡山県岡山市学館町2丁目7番25号

【請求項の転出】

【請求項1】 配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相同的なアミノ酸配列（ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有し、免疫担当細胞においてインターフェロン γ の産生を誘導するポリペプチド。

【請求項2】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNA。

【請求項3】 配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項2に記載のDNA。

【請求項4】 遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換した請求項2又は3に記載のDNA。

【請求項5】 配列表における配列番号6に示す塩基配列（ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有する請求項2、3又は4に記載のDNA。

【請求項6】 ヒトに由来する請求項2、3、4又は5に記載のDNA。

【請求項7】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNA。

【請求項8】 DNAが配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項7に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項9】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項7又は8に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項10】 DNAが配列表における配列番号6に示す塩基配列（ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有する請求項7、8又は9に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項11】 DNAがヒトに由来する請求項7、8、9又は10に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項12】 ベクターがプラスミドベクターである請求項7、8、9、10又は11に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項13】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体。

【請求項14】 DNAが配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項13に記載の形質転換体。

【請求項15】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項13又は14に記載の形質転換体。

【請求項16】 DNAが配列表における配列番号6に示す塩基配列（ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有する請求項13、14又は15に記載の形質転換体。

【請求項17】 DNAがヒトに由来する請求項13、14、15又は16に記載の形質転換体。

【請求項18】 ベクターがプラスミドベクターである請求項13、14、15、16又は17に記載の形質転換体。

【請求項19】 宿主が細菌である請求項13、14、15、16、17又は18に記載の形質転換体。

【請求項20】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を培養培地で培養し、産生したポリペプチドを培養物から採取してなるポリペプチドの製造方法。

【請求項21】 DNAが配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項20に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項22】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項20又は21に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項23】 DNAが配列表における配列番号6に示す塩基配列（ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有する請求項20、21又は22に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項24】 DNAがヒトに由来する請求項20、21、22又は23に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項25】 ベクターがプラスミドベクターである請求項20、21、22、23又は24に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項26】 宿主が細菌である請求項20、21、22、23、24又は25に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項27】 産生したポリペプチドを塩析、透析、

液相、液相、ゲル電気泳動、ゲル電気泳動クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動及び、又は等電点電気泳動により採取する請求項20、21、22、23、24、25又は26に記載のポリペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【00001】

【発明の属する技術分野】この発明は、免疫担当細胞においてインターフェロン-γ（以下、「IFN-γ」と略記する。）の産生を誘導する新規なポリペプチドに関するものである。

【00002】

【従来の技術】IFN-γは、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、免疫調節作用を有する蛋白質として知られ、抗原やマイトジェンによる刺激を受けた免疫担当細胞が産生すると云われている。これら生物作用ゆえに、IFN-γはそれら見当初より抗腫瘍剤としての実用化が望まれ、現在では抗腫瘍を始めとする悪性腫瘍一般の治療剤として精力的に臨床試験が進められている。現在入手し得るIFN-γは免疫担当細胞が産生する天然型IFN-γと、免疫担当細胞から採取したIFN-γをコードするDNAを大腸菌に導入してなる形質転換体が産生する組換え型IFN-γに大別され、上記臨床試験においては、これらのうちのいずれかを「外来IFN-γ」として投与されている。

【00003】このうち、天然型IFN-γは、通常、培養分化した免疫担当細胞をIFN-γ誘導剤を含む培養液中で培養し、その培養液を精製することにより製造される。この方法では、IFN-γ誘導剤の種類がIFN-γの産生に大きく影響し、さらには、製品の安全性にも多大の影響を及ぼすと云われており、通常、コンカバリンA、コンデニン、アミカサマコサウロキチン、ポリイソブレン、リボネチンなどのマイトジェンが用いられる。しかしながら、これら物質は、いずれも分子が複雑であり、精製や精製方法によって品質が変動し易く、誘導剤に一定したIFN-γ誘導剤を所定量入手し難いという問題がある。これらで、上記物質の多くは生体に投与すると顕著な副作用を示したり、物質によっては毒性を示すものもあり、生体に直接投与してIFN-γの産生を誘導するのが極めて困難であった。

【00004】

【発明が解決しようとする課題】斯かる状況に鑑み、この発明の目的は、免疫担当細胞においてIFN-γの産生を誘導する新規なポリペプチドを提供することにある。

【00005】この発明の別の目的は、斯かるポリペプチドをコードするDNAを提供することにある。

【00006】この発明のさらに別の目的は、斯かるDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組

換えDNAを提供することにある。

【00007】この発明のさらに別の目的は、斯かる組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を提供することにある。

【00008】この発明のさらに別の目的は、斯かる形質転換体を用いる上記ポリペプチドの製造方法を提供することにある。

【00009】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記第一の課題を、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相等的なアミノ酸配列を有するポリペプチドにより解決するものである。

【00010】この発明は、上記第二の課題を、斯かるポリペプチドをコードするDNAにより解決するものである。

【00011】この発明は、上記第三の課題を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAにより解決するものである。

【00012】この発明は、上記第四の課題を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体により解決するものである。

【00013】この発明は、上記第五の課題を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を一部細胞で培養し、産生したポリペプチドを培養液から採取してなるポリペプチドの製造方法により解決するものである。

【00014】

【発明の実施の形態】この発明のポリペプチドは、前述のとおり、従来のIFN-γとほぼ同様に機能するアミノ酸配列を有しており、免疫担当細胞に作用又は刺激作用とともに作用させると、IFN-γの産生を促進する。

【00015】この発明のDNAは、自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えDNAとし、この組換えDNAを、通常、宿主ポリペプチドを産生しないけれども、容易に増殖させることのできる宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該ポリペプチドの産生を促進する。

【00016】この発明の複製可能な組換えDNAは、通常、細胞ポリペプチドを産生しないけれども、容易に増殖させることのできる宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該ポリペプチドの産生を促進する。

【00017】この発明の形質転換体は、培養すると、当該ポリペプチドを産生する。

【00018】斯かる形質転換体をこの発明の製造方法にしたがって培養すれば、所望量のポリペプチドが容易に得られる。

【0019】この発明は、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する新規な蛋白質の発見に基づくものである。本発明者、哺乳類由来の細胞が産生するサイトカイン類につき研究していたところ、マウスの肝臓中に、IFN- γ の産生を誘導する従来未知の全く新規な蛋白質が存在することを見出した。ウラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてこの蛋白質を単離し、その部分アミノ酸配列を決定するとともに、マウス肝臓細胞から単離したmRNAを鋳型に上記部分アミノ酸配列に基づき化学合成したプライマーの存在下でRT-PCR反応させて蛋白質を部分コードするDNA断片を採取し、これをプローブにして上記mRNAから別途作製したcDNAライブラリーを鋭意検索したところ、471塩基対からなる、配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片が得られた。この塩基配列を解読したところ、マウス肝臓から単離した蛋白質は157個のアミノ酸からなり、配列番号3に併記したアミノ酸配列を有することが半明した。なお、その配列番号3において、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸はメチオニン又はトレオニンを表わすものとする。

【0020】これらの知見に基づき、本発明者がヒト肝臓細胞由来のmRNAを鋭意検索したところ、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する、さらに別のポリペプチドをコードする遺伝子が存在することを見出した。この遺伝子は配列表における配列番号2に示す塩基配列を有しており、解読したところ、157個のアミノ酸からなる、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列のポリペプチドをコードしていることが半明した。なお、その配列番号1において、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。

【0021】配列表における配列番号1及び2に示すアミノ酸配列及び塩基配列を解明するに到った一連の操作を要すると、次のようになる。

(1) ウラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてマウス肝臓細胞から免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する蛋白質を単離し、高度に精製した。

(2) 精製蛋白質をトリブリン消化し、消化液から2種類のペプチド断片を単離し、アミノ酸配列を決定した。

(3) マウス肝臓細胞からmRNAを採取し、これを鋳型に上記部分アミノ酸配列に基づき化学合成したプライマーとしてのオリゴヌクレオチドの存在下でRT-PCR反応させてDNA断片を調製する一方、それら部分アミノ酸配列に基づき別途化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブにしてそれらDNA断片を検査し、蛋白質を部分コードするDNA断片を得た。

(4) このDNA断片を同位体標識した後、前記mRNAを鋳型に調製したcDNAライブラリーにハイブリ

ダイズさせ、顕著な会合を示した形質転換体を採取した。

(5) 形質転換体からcDNAを採出し、塩基配列を決定し、解読するとともに、解読したアミノ酸配列と前記部分アミノ酸配列を比較することにより、蛋白質が配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を有し、マウスにおいて、このアミノ酸配列が配列番号3に併記した塩基配列によりコードされていることを確認した。

(6) さらに、ヒト肝臓細胞由来のmRNAを鋳型にcDNAライブラリーを作製する一方、配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片を調製し、同位体標識した後、上記cDNAライブラリーにハイブリダイズさせ、顕著な会合を示した形質転換体を採取した。

(7) 形質転換体からcDNAを採出し、塩基配列を決定し、解読したところ、この発明のポリペプチドは配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有することがあり、ヒトにおいて、このアミノ酸配列は配列表における配列番号2に示す塩基配列によりコードされていることを確認した。

【0022】免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導するこの発明のポリペプチドは、本発明者の長年に亘る研究の一成果として見出されたものであり、配列表における配列番号1に見られるごとく、従来公知のポリペプチドとは明らかに相違するアミノ酸配列を有している。天然由来のポリペプチドであるか、組換えDNA技術により創製されたポリペプチドであるか、それが配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相等的なアミノ酸配列を有するかぎり、すべてこの発明に包含されるものである。配列番号1のアミノ酸配列に相等的なアミノ酸配列を有する変異体は、同様に生物作用を実質的に発現することなく、配列番号1のアミノ酸配列におけるアミノ酸の1個又は2個以上を他のアミノ酸で置換することにより得ることからできる。なお、同じDNAであっても、それを導入する宿主や、そのDNAを含む形質転換体の培養に使用する媒体、培養成分・組成や培養温度・pHなどに依っては、宿主細胞によってDNA発現量の多寡などに伴い、所望の生物作用は発現しているものか、配列番号1のアミノ酸配列における1個及び/又はC-末端のアミノ酸が1個又は2個以上欠失したり、N-末端に1個又は2個以上のアミノ酸が新たに付加した変異体の産生することもある。但し変異体も、それを免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する場合は、当然、この発明の範囲内に包含される。

【0023】この発明のポリペプチドは、それをコードしたDNAを含む形質転換体を培養媒体で培養し、産生したポリペプチドを培養物から採取することにより製造することができる。この発明で使用する形質転換体は、例えば、配列表における配列番号2、6の塩基配列若しくはそれに相等的な塩基配列又はそれらに相等的な塩基配列のDNAを適宜宿主に導入することにより得ること

10

20

30

40

50

ができる。なお、上記塩基配列は、遺伝子コードの縮重を利用して、コードするアミノ酸配列を変えることなく、塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置き換えてもよい。また、DNAが宿主中で実際に当該ポリペプチドの産生を発現するために、当該ポリペプチド又はその相同変異体をコードする塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で適宜置換し得ることは云うまでもない。

【0024】この発明で使用するDNAは、それが前述のような配列を有するかぎり、それが天然に由来するものか人為的に合成されたものであるかは問わない。天然の給源としては、例えば、ヒトの肝臓が挙げられ、その細胞からは、例えば、配列表における配列番号6に示す塩基配列のDNAを含む遺伝子が得られる。すなわち、例えば、市販のポリ(A)付加ヒト肝臓mRNAを蔗糖濃度勾配などにより分画してmRNAを単離する。このmRNAを鋳型に逆転写酵素とポリメラーゼを作用させて二重鎖cDNAとし、これを自律複製可能な適宜ベクターに挿入し、得られた組換えDNAを大腸菌などの適宜宿主に導入して形質転換体とする。この形質転換体を栄養培地で培養し、培養物にコロニーハイブリダイゼーション法を適用してこの発明のポリペプチドをコードするDNAを含む形質転換体をスクリーニングする。スクリーニングされた形質転換体を通常一般の方法により処理すれば、この発明のDNAが得られる。一方、この発明のDNAを人為的に合成するには、例えば、配列表における配列番号2に示す塩基配列に基づいて化学合成するか、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列をコードするDNAを自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えDNAとし、これを適宜宿主に導入して得られる形質転換体を培養し、培養物から菌体を分離し、その菌体から当該DNAを含むプラスミドを採取すればよい。

【0025】斯かるDNAは、通常、組換えDNAの形で宿主に導入される。組換えDNAは、通常、DNAと自律複製可能なベクターを含んでなり、DNAが入手できれば、通常一般の組換えDNA技術により比較的内容に調製することかできる。斯かるベクターの例としては、例えば、pKK223-2、pGEX-2T、pRL-2、pBTrp2-DNA、pUB110、YEp13、Tiプラスミド、Riプラスミド、pBI121などのプラスミドベクターが挙げられ、このうち、この発明のDNAを大腸菌、枯草菌、酵母などの原核生物で発現させるにはpKK223-2、pGEX-2T、pRL-2、pBTrp2-DNA、pUB110、YEp13が、また、動物細胞中の細胞で発現させるにはTiプラスミド、Riプラスミド、pBI121が好適である。

【0026】斯かるベクターにこの発明のDNAを挿入するには、斯等において通常一般の方法が採用される。具体的には、先ず、この発明のDNAを含む遺伝子と自

律複製可能なベクターとを制限酵素及び又は超音波により切断し、次に、生成したDNA断片とベクター断片とを連結する。遺伝子及びベクターの切断にヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、とりわけ、II型に制限酵素、詳細には、Sau 3A I、Eco R I、Hind III、Bam HI、Sal I、Xba I、Sac I、Pst Iなどを使用すれば、DNA断片とベクター断片を連結するのが容易となる。DNA断片とベクター断片を連結するには、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外でDNAリガーゼを作用させればよい。斯くして得られた組換えDNAは、適宜宿主に導入して形質転換体とし、これを培養することにより無限に複製可能である。

【0027】この発明による組換えDNAは、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母を始めとする適宜の宿主に導入することができる。宿主が大腸菌の場合には、宿主を組換えDNAとカルシウムイオンの存在下で培養すればよく、一方、宿主が枯草菌の場合には、コンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。形質転換体をクローニングするには、コロニーハイブリダイゼーション法を適用するか、栄養培地で培養し、免疫反応細胞においてIFN- γ の産生を誘導するポリペプチドを産生するものを選択すればよい。

【0028】斯くして得られる形質転換体は、栄養培地で培養すると、菌体又は細胞外に当該ポリペプチドを産生する。栄養培地には、通常、炭素源、窒素源、ミネラル、さらには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量栄養素を補足した通常一般の培養培地が使用され、個々の炭素源としては、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖などの糖質が、また、窒素源としては、例えば、アンモニア乃至アンモニウム塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コーンステアーリカー、肉エキスなどの含窒素無機乃至有機物が挙げられる。形質転換体を培養する栄養培地に接種し、栄養培地を温度25乃至65°C、pH5乃至8に保ちつつ、所定期間などによる好適的条件下で約1乃至10日間培養すれば、当該ポリペプチドを含む培養物が得られる。この培養物はIFN- γ 誘導剤としてそのまま使用可能なこともあるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、超音波や細胞溶解酵素により菌体を破砕した後、濾過、遠心分離などにより当該ポリペプチドを菌体又は菌体破砕物から分離し、精製する。精製には菌体又は菌体破砕物を除去した培養物に、例えば、塩析、透析、濃縮、濃縮、分溶柱層、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーミング、ゲル電気泳動、等電気泳動などの生理活性物質を精製するための斯等における通常一般の方法が適用でき、必要に応じて、これらの方法を適宜組合せればよい。そして、最終使用形態に応じて、精製したポリ

ペプチドを濃縮・凍結乾燥して液状又は固状にすればよい。

【0029】前述のとおり、この発明のポリペプチドは、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する性質を有する。この性質により、この発明のポリペプチドは、細胞培養法によりIFN- γ を製造の際の誘導剤として、さらには、IFN- γ に感受性を有する、例えば、エイズや尖圭コンジロームなどのウイルス性疾患、腎臓癌、肉腫腫、歯肉肉腫、肺腫瘍などの悪性腫瘍、関節リウマチやアレルギー症などの免疫疾患に対する治療剤・予防剤として有用である。

【0030】この発明のポリペプチドは、通常、免疫担当細胞を培養してIFN- γ を製造するための培養培地に共存させるか、IFN- γ 感受性疾患の治療・予防のために哺乳類の体内に直接投与される。すなわち、前者の用途においては、哺乳類の末梢血から分離される白血球や、例えば、HBL-38細胞、Mo細胞、Jurkat細胞、HuT78細胞、EL4細胞、L12-10細胞などの培養株化された免疫担当細胞をこの発明のポリペプチドを1ml当たり約0.1ng乃至1 μ g、望ましくは、約1乃至100ng含む適宜の培養培地に浮遊させる。必要に応じて、培養培地にマイトゲンやインターロイキン2、抗CD3抗体などのT細胞刺激物質を加え、培養培地を温度約30乃至40℃、pH約5乃至8に保ちつつ、培養培地を適宜頻度（例えば毎時）から、通常一般の方法により約1乃至100時間培養する。断片して得られる培養物を生理的塩溶液に精製するための慣用的方法、すなわち、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈降、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの1種又は2種以上を適宜組合せて適用することにより、IFN- γ を採取することが出来る。

【0031】一方、IFN- γ 感受性疾患の治療・予防のためには、哺乳類の体内にこの発明のポリペプチドを直接投与すればよい。具体的には、この発明のポリペプチドを投与に適した適宜経路に投与後、哺乳類に経口又は経鼻投与するか、例えば、皮下、皮内、筋内、静脈内又は腹腔内に注射投与する。この発明のポリペプチドを投与し得る哺乳類は特に限定されず、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、サルなどの哺乳動物であってもよい。この発明のポリペプチドは強力なIFN- γ 誘導能を有することから、一般に少量で所期のIFN- γ 産生を誘導でき、また、毒性が極めて低いことから、多量投与しても重篤な副作用を惹起することはない。したがって、この発明のポリペプチドは、使用に際して用量を厳密に管理しなくとも、所望IFN- γ 産生を迅速に誘導できる利点がある。なお、急のため

に申し述べると、この発明のポリペプチドは医薬品としての安全性の要件を充たしている。

【0032】以下、実施例に基づきこの発明を説明するが、そこで用いられる手法は断片において慣用的ものであり、例えば、ティーマニヤティス等『モレキュラー・クロニング・ア・ラボラトリー・マニュアル』、1989年、コールド・スプリング・ハーバー発行や、村松正実『ラボマニュアル遺伝子工学』、1988年、丸善出版発行などにも詳述されている。

【0033】

【実施例1 精製蛋白質の調製】8週齢の雌CD-1マウス600匹に腹腔内にコロネバクテリウム・バルバム(ATCC11827)を60℃で1時間加熱して調製した死菌体を1mg/匹注射投与し、通常一般の方法で7日間飼育後、静脈内に大腸菌由来の精製リボ多糖を1 μ g/匹注射投与した。1乃至2週間後、マウスを屠殺し、採血後、肝臓を摘出し、8倍容の50mM磷酸緩衝液(pH7.3)中、ホモゲナイザーにより破碎して抽出した。抽出物を約8,000rpmで20分間遠心分離し、得られた上清約91に硫酸アンモニウムで飽和させた50mM磷酸緩衝液(pH7.3)を硫酸アンモニウムが45%飽和になるように加え、4℃で18時間静置後、約8,000rpmで30分間遠心分離して上清約191を採取した。

【0034】この上清を予め1M硫酸アンモニウムを含む50mM磷酸緩衝液(pH7.3)で平衡化させておいたファルマシア製「フェニルセファロース」約4.6lのカラムに負荷し、カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、1Mから0.2Mに上昇する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、50mM磷酸緩衝液(pH7.3)をS.V.0.57で通液した。硫酸アンモニウム濃度が0.8M付近のときに溶出した画分約4.8lを採取し、膜濃縮し、20mM磷酸緩衝液(pH6.5)に対して4℃で18時間透析後、予め20mM磷酸緩衝液(pH6.5)で平衡化させておいたファルマシア製「DEAE-セファロース」約250mlのカラムに負荷した。カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、0Mから0.2Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに20mM磷酸緩衝液(pH6.5)をS.V.1.2で通液し、塩化ナトリウム濃度0.13M付近で溶出した画分約260mlを採取した。

【0035】この画分を濃縮し、25mMピストリス緩衝液(pH7.1)に対して4℃で18時間透析後、予め新鮮な同一緩衝液で平衡化させておいたファルマシア製「Mono-P」約24mlのカラムに負荷し、pH7からpH4に下降するpH4透析液、カラムに10% (v/v) ポリバース74 (pH4.0)を通液した。pH4約4.3のときに溶出した画分約23mlを採取し、濃縮し、予め7mM磷酸小索にナトリウム、3mM磷酸二水素ナトリウム及び139mM塩化ナトリウ

ムからなる混液(pH7.0)で平衡化させておいたフェルマシア製『スーパードックス75』のカラムに負荷し、新鮮な同一混液を通過してゲル透過クロマトグラフィーしたところ、分子量19,000ダルトン付近に目的とする蛋白質が溶出した。蛋白質を含む画分を採取し、濃縮して下記の実施例2に供した。収量は、マウス1匹当たり約0.6 μ gであった。

【0036】

【実施例2 部分アミノ酸配列】実施例1で調製した精製蛋白質を含む水溶液の一部をとり、約50 μ lまで濃縮した。濃縮物に3% (w/v) SDS、60% (v/v) グリセロール及びジチオトレイトール60mg/mlからなる混液25 μ lを加え、50℃で30分間インキュベート後、15% (w/v) ポリアクリルアミドゲル上に移し、常法にしたがって電気泳動した。その後、ゲルを0.1% (w/v) クーマシーブリリアントブルーR250を含む50% (v/v) 水性メタノールと10% (v/v) 酢酸水溶液の混液に浸漬して染色し、12% (v/v) 水性メタノールと7% (v/v) 酢酸水溶液の混液で繰返し濯いで染色し、蒸留水中に18時間浸漬して洗浄後、ゲルよりクーマシーブリリアントブルー染色されたIFN- γ 誘導活性ある部分を切出し、凍結乾燥した。

【0037】次に、乾燥ゲルをシグマ製TPCKトリプシン(2 μ g/mlを含む100mM塩化ナトリウム、0.5mM塩化カルシウム及び0.02% (v/v) Tween 20水溶液からなる混液)0.6mlに浸漬し、37℃で18時間インキュベートして蛋白質をトリプシン消化した。そして、消化物を遠心分離して上清を採取する一方、沈殿部を0.001% (v/v) Tween 20を含む1% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸1mlに浸漬し、室温で4時間振盪後、遠心分離して上清を採取した。新たに生じた沈澱を0.001% (v/v) Tween 20を含む70% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸、0.001% (v/v) Tween 20を含む50% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸及び80% (v/v) 水性アセトニトリルの順序で上記と同様に処理し、得られた上清と上記で得られた上清をマージし、250 μ lまで濃縮後、遠心分離した。

【0038】断片して得られたパプチ断片を含む水溶液を、予め0.1% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸で平衡化させておいた東ソー製吸着体クロマトグラフィー用カラム(HPLC-ODS-120T)に負荷し、カラムを0.1% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸で洗浄後、溶出液中のペプチド濃度を吸光度計により214nm及び280nmの波長下でモニタしながら、0% (v/v) から70% (v/v) に上昇する水性アセトニトリルの濃度溶液、カラムを0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸を0.5ml/分の流速で流液した。そして、通液開始から約7.5分後又は約5.5分後に溶出し

た画分(以下、それぞれ『パプチ断片A』又は『パプチ断片B』と云う。)を別々に採取した。このときの溶出パターンを図1に示す。

【0039】その後、パーキン・エルマー製蛋白質・シーケンサ『473A型』を使用し、常法にしたがってこれらパプチ断片A及びBのアミノ酸配列を調べたところ、それぞれ、配列表における配列番号4及び5に示すアミノ酸配列を有していた。

【0040】

【実施例3 蛋白質をコードするDNAの塩基配列と蛋白質のアミノ酸配列】

【0041】

【実施例3-1 全RNAの調製】実施例1と同様にして調製したマウス脾細胞を室温で3gとり、これを6Mグアニジンイソチオシアネート、10mMクエン酸ナトリウム及び0.5% (w/v) SDSからなる混液(pH7.0)20mlに浸漬し、ホモゲナイザーで破碎した。常法にしたがって、35ml容遠心管に5.7M塩化セシウムを含む0.1M EDTA(pH7.5)を25ml注入し、その上部に細胞破碎物を10ml重層し、この状態で20℃、25,000rpmで20時間超遠心分離後、RNA画分を採取した。このRNA画分を15ml容遠心管にとり、等容量のクロロホルム・ブタノール混液(4:1)を加え、5分間振盪し、4℃、10,000rpmで10分間遠心分離した後、水層部を採取し、2.5倍容のエタノールを加え、-20℃で2時間放置して全RNAを沈澱させた。この沈澱を採取し、75% (v/v) 水性エタノールで洗浄後、液を蒸留水0.5mlに溶解して下記の実施例3-2に供した。なお、全RNAの収量は約4mgであった。

【0042】

【実施例3-2 蛋白質を部分コードするDNA断片の調製】実施例3-1で調製した全RNA 1 μ gに25mM塩化マグネシウムを4 μ l、10 \times PCR緩衝液

100mMトリス-ヒドロキシ酸(pH8.5)、500mM塩化カリウムを2 μ l、1mM dNTPキヌアスを8 μ l、1単位/ μ lのRNAseインヒビターを1 μ l、2.5単位/ μ lの逆転写酵素を1 μ l及び2.5 μ Mカプシムキヌアマーを1 μ l加え、滅菌蒸留水で20 μ lとした。混合物を0.5ml容遠心管にとり、常法にしたがって25℃で10分間、42℃で30分間、99℃で5分間、5℃で5分間インキュベートして逆転写酵素反応させ、第一ストランドcDNAを含む溶液を得た。

【0043】1 \times 第一ストランドcDNA水溶液20 μ lに25mM塩化マグネシウムを4 μ l、10 \times PCR緩衝液を8 μ l、2.5単位/ μ lアンプリファークDNAPリメラーゼを0.5 μ l、さらに、センスプライマー又はアンチセンスプライマーとしてプライマー1及びプライマー2をそれぞれ0.1 μ mol/lずつ加え、滅菌蒸留

13

水で100 μ lとした。そして、常法により、混合物を9.4℃で1分間、45℃で2分間、72℃で3分間の順序でインキュベートするサイクルを40回繰返して反応させ、第一ストランドcDNAを鋳型に当該蛋白質を部分コードするDNA断片を増幅した。なお、プライマー1及びプライマー2は、配列表の配列番号4及び5におけるPro-Glu-Asn-Ile-Asp-Asp-Ile又はPhe-Glu-Asp-Met-Thr-Asp-Ileで表わされるアミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドであり、それぞれ5'-ATRTCTCTCDATRTTTCNGG-3'又は5'-TTYGARGAYATGACNGAYAT-3'で表わされる塩基配列を有していた。

【0044】このようにして得たPCR産物の一部をとり、常法により2% (w/v) アガロースゲル上で電気泳動して分画し、ナイロン膜上に移取り、0.4N水酸化ナトリウムで固定し、2 \times SSCで洗浄し、風乾後、5 \times SSPE、5 \times デンハルト液、0.5% (w/v) SDS及び100 μ g/ml変性サケ精子DNAを含むプレハイブリダイゼーション混液に浸漬し、65℃で3時間インキュベートした。別途、プローブ1として、配列表の配列番号4におけるPhe-Glu-Glu-Met-Asp-Proで表わされるアミノ酸配列に基づき5'-TTYGARGARATGGAYCC-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、 γ -³²P-ATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼにより同位体標識した。このプローブ1を1pmolとり、これと5 \times SSPE、5 \times デンハルト液、0.5% (w/v) SDS及び100 μ g/ml変性サケ精子DNAを含む混液にナイロン膜を浸漬し、45℃で24時間インキュベートしてハイブリタイズさせた。ナイロン膜を6 \times SSCで洗浄後、常法によりオートラジオグラフィしたところ、目的とするDNA断片がPCR産物に含まれていた。

【0045】次に、残りのPCR産物を直接転写プロセス「トウター」pT7ブルー-T₇を50ngと適量のT₇ DNAリカーゼを加え、さらに、1.00mM ATPを最終濃度1mMに加えた後、16℃で18時間インキュベートして「トウター」pT7ブルーにDNA断片を挿入し、得られた組換えDNAをコロニドセル法によりマニファスト製法培養菌「NoVa-B1ue」中に導入して形質転換体とした。得られた形質転換体を10 μ g/mlバクタトリプシン、2.5 μ g/ml塩化ナトリウム、1.5 μ g/mlイソアミダー、1.00mg/mlアンピシリン、46mg/l Na-Gal及び23.8mg/lイソプロピル β -D-チオガラクトピノシド（以下、「IPTG」と略記する。）を含むプレート培地に接種し、37℃で24時間培養してコロニーを形成させた。常法にしたがって、プレート培地にナイロン膜を載せ、約30秒間静置してコロニーを採取した後、ナイロ

14

ン膜を分離し、0.5N水酸化ナトリウム及び1.5M塩化ナトリウムを含む混液に7分間浸漬して腐蝕した。その後、ナイロン膜を1.5M塩化ナトリウムを含む0.5Mトリス-塩酸緩衝液（pH7.2）に3分間浸漬し、2 \times SSCで洗浄し、0.4N水酸化ナトリウムに20分間浸漬して固定し、5 \times SSCでさらに洗浄し、風乾後、5 \times SSPE、5 \times デンハルト液、0.5% (w/v) SDS及び100 μ g/ml変性サケ精子DNAを含むプレハイブリダイゼーション混液に浸漬し、65℃で3時間インキュベートした。その後、常法にしたがってナイロン膜にプローブ1をハイブリタイズさせ、6 \times SSCで洗浄後、前記と同様にオートラジオグラフィし、プローブ1と顕著な会合を示した形質転換体をプレート培地から採取した。

【0046】この形質転換体をアンピシリン100 μ g/mlを含むL-ブロス培地（pH7.2）に接種し、37℃で18時間培養後、培養物から菌体を採取し、通常のアルカリ-SDS法により組換えDNAを採取した。シデオキン法により調べたところ、この組換えDNAは配列表の配列番号3に示す塩基配列における第85乃至281番目に相当する塩基配列中のDNA断片を含んでいた。

【0047】

【実施例3-3 mRNAの調製】実施例3-1で調製した全RNAを含む溶液を0.05mlとり、これに1mM EDTAと0.1% (w/v) SDSを含む10mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）を0.5ml加え、混濁液の全量を1mlとした。混合液を日本コロムビア製シリカd(T)₁₈ラテックスシリカゲル-dT30スーパーストを1ml加え、65℃で5分間加熱して洗浄させた後、直ちに氷浴中で3分間冷却した。5ml水酸化ナトリウムを0.2mlを加え、37℃で10分間インキュベートし、25℃、10,000rpmで10分間遠心分離し、上清を除いて得られたペレット状のシリカゲルを0.5mlを加えて懸濁させ、65℃で5分間インキュベートしてシリカゲルから5mk RNAを抽出された。抽出したmRNAは約5 μ gであった。

【0048】

【実施例3-4 cDNAライブラリーの作成】アマゾン製cDNAクローニングキット「cDNA合成システム」を用いて、実施例3-3で調製したmRNAからcDNAライブラリーを作製した。すなわち、1.5mlの反応液に第一ストランドcDNA合成用溶液4 μ l、ポリリ、酸ナトリウム溶液1 μ l、ヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター溶液1 μ l、デオキシヌクレオチド三リン酸溶液2 μ l及びシリカd(T)₁₈プライマー溶液1 μ lをこの順序で加え、さらに、実施例3-3で調製したmRNAを2 μ g加えた後、滅菌炭留水で19 μ lとした。混合物に逆転写酵素20単位を含

10

20

30

40

50

も溶液 $1\mu\text{l}$ を加え、 42°C で40分間インキュベートして第一ストランドcDNAを含む反応物を得た。

【0049】反応物に第二ストランドcDNA合成用溶液を $37.5\mu\text{l}$ 、大腸菌由来のリソマクレーゼHを0.8単位、DNAポリメラーゼIを2.3単位この順序で加え、滅菌蒸留水で $100\mu\text{l}$ とした後、 12°C で60分間、 22°C で60分間インキュベートし、T4 DNAポリメラーゼを2単位加え、 37°C でさらに10分間インキュベートして第二ストランドcDNAを含む反応物を得た。反応物に 0.25M EDTA (pH8.0)を $4\mu\text{l}$ 加えて反応を停止させた後、常法によりフェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿してcDNAを採取した。

【0050】このようにして得たcDNAにL⁻K緩衝液を $2\mu\text{l}$ 、EcoRIアダプターを 250pmol 、T4 DNAリガーゼを2.5単位この順序で加え、滅菌蒸留水で $20\mu\text{l}$ とした後、 15°C で16時間インキュベートしてcDNA両端にEcoRIアダプターを連結した。反応物に 0.25M EDTAを $2\mu\text{l}$ 加えて酵素を失活させ、常法により分子篩クロマトグラフィーにより未反応のEcoRIアダプターを除去し、L⁻K緩衝液を $40\mu\text{l}$ とT4ナリマクレオチドキナーゼを80単位加え、滅菌蒸留水で全量 $400\mu\text{l}$ とし、 37°C で30分間インキュベートしてEcoRI切断部位をメチル化した後、反応物をフェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿してDNAを採取した。DNAに適量の $\lambda\text{gt}10$ アームを含むL⁻K緩衝液を $1.5\mu\text{l}$ とT4 DNAリガーゼを2.5単位加え、滅菌蒸留水で全量 $15\mu\text{l}$ とし、 15°C で16時間インキュベートしてライゲートした後、通常の生体外パッケージングを適用して組換えDNAを含むファージを得た。

【0051】

【実施例3-5 組換えDNAのクローニング】アマニシム製菌苗NM514株に実施例3-2で調製したファージを常法により感染させた後、 10g の1バクトリアクト、 5g の1バクトイーストエキストラクト、 10g の1増殖ナトリウム及び 15g の1バクトアカーを含む寒剤培地(pH7.0)に接種し、 37°C で16時間培養してフлакを形成させた。寒剤培地にナイロン膜を載置し、約30秒間静置してフлакを採取し、剥離した後、先ず、 0.5M 水酸化ナトリウムと 1.5M 塩化ナトリウムを含む水溶液に7分間、次に、 1.5M 塩化ナトリウムを含む 0.5M トリプシン緩衝液(pH7.0)に3分間それぞれ操作を繰り返した。ナイロン膜を $2\times\text{SSC}$ で濯ぎ、風乾し、 0.4N 水酸化ナトリウムに20分間浸漬し、 $5\times\text{SSC}$ でさらに濯ぎ、風乾し、 $5\times\text{SSPE}$ 、 $5\times\text{デンハルト溶液}$ 、 0.5% (w/v) SDS及び変性サケ精子DNAを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む混液に浸漬し、 65°C で3時間インキュベートし

た。別途、実施例3-2で調製したcDNA断片をアマニシム製DNA標識キット『レティ・プライムDNA標識システム』により ^{32}P 標識してプローブ2とし、その適量と $5\times\text{SSPE}$ 、 $5\times\text{デンハルト溶液}$ 、 0.5% (w/v) SDS及び変性サケ精子DNAを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む混液にナイロン膜を載置し、 65°C で20時間インキュベートしてハイブリダイズさせた後、室温下、 $6\times\text{SSC}$ 中で20分間、 $2\times\text{SSC}$ 中でさらに20分間インキュベートし、洗浄し、オートラジオグラフィーし、プローブ2に顕著な結合を示したフェージDNAクロンを採取した。

【0052】常法にしたがってこのクロンを大腸菌中で増殖し、菌体から組換えDNAを抽出した。組換えDNAを制限酵素EcoRIで切断する一方、プラスミドベクターpUC19(ATCC37254)を同じ制限酵素で切断し、得られたDNA断片とプラスミド断片を常法によりDNAリガーゼで連結して組換えDNAとした。そして、この組換えDNAを通常のコンピテントセル法により大腸菌JM109株(ATCC53323)に導入し、形質転換体を得た。

【0053】

【実施例3-6 DNAの塩基配列と蛋白質のアミノ酸配列の決定】実施例3-5で調製した形質転換体をレーブロス培地(pH7.2)に接種し、 37°C で18時間振盪培養した。培養物から形質転換体を採取し、通常のアルカリ・SDS法により処理してこの発明のDNAを含む組換えDNAを得た。蛍光光度計を使用する自動シーケンサにより分析したところ、この組換えDNAは配列表における配列番号3に示す塩基配列を含んでおり、解読したところ、同じく配列番号3に示すアミノ酸配列をコードしていることが判明された。このアミノ酸配列においては、その第79乃至103番目又は第26乃至43番目の配列表における配列番号4及び5に示す部分アミノ酸配列が含まれており、このことは、マウスにおいて、配列番号3に示すアミノ酸配列のポリペプチドが、同じく配列番号3に示す塩基配列のDNAによりコードされていることを示している。なお、その配列番号3において、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸はメチオニン又はトレオニンを表わすものとする。

【0054】この実施例4乃至7では、配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片をプローブに使用し、ヒト肝臓mRNAから免疫阻害調節においてIFN γ の産生を誘導するマウス細胞因子遺伝子をコードするcDNAを採取する。そして、そのcDNAの塩基配列を決定し、解読して、この読取りによるポリペプチドのアミノ酸配列を決定するとともに、cDNAを大腸菌で発現させ、産生したポリペプチドの性質・性状を調べる。

【0055】

【実施例4 ポリペプチドをコードするDNAの塩基配

列とポリヌクレオチドのアミノ酸配列]

【0056】

【実施例4-1 cDNAライブラリーの作製】アマシヤム製cDNAクローニングキット『cDNA合成システム・プラス』を使用し、クローンテック製ポリ(A)付加ヒト肝臓RNAからcDNAライブラリーを作製した。すなわち、1. 5ml容反応管に第一ストランドcDNA合成用溶液を10 μ l、1mMピロリン酸ナトリウム溶液を2. 5 μ l、1 μ g/ μ lヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター溶液を2. 5 μ l、1 μ g/ μ l 10-テオキシメクレオチト三磷酸溶液を5 μ l及び1 μ g/ μ lオリゴdTプライマー溶液を2. 5 μ lとり、ポリ(A)付加ヒト肝臓RNAを5 μ g加え、滅菌蒸留水で45 μ lとした後、逆転写酵素を100単位含む溶液を5 μ l加え、42℃で40分間インキュベートして第一ストランドcDNAを含む反応物を得た。

【0057】反応物に第二ストランドcDNA合成用溶液を93. 5 μ l、大腸菌由来のリボヌクレアーゼIIを4単位、DNAポリメラーゼを115単位加え、滅菌蒸留水で250 μ lとし、12℃で60分間、22℃で60分間、70℃で10分間この順序でインキュベートした後、T4ポリメラーゼを10単位加え、37℃でさらに10分間インキュベートした。0. 25M EDTA (pH8. 0)を10 μ l加えて反応を停止させた後、反応物を常法にしたがってフェノール/クロロホルム抽出し、抽出物をエタノール沈殿して第二ストランドcDNAを得た。

【0058】このようにして得た第二ストランドcDNAにL. K緩衝液(pH8. 0)を2 μ l、EcoRIアダプタを250 μ mol、T4 DNAリナーゼを2. 5単位加え、滅菌蒸留水で20 μ lとし、15℃で16時間インキュベートしてcDNAの両端にEcoRIアダプタを連結した後、0. 25M EDTA (pH8. 0)を2 μ l加えて反応を停止させた。分子篩クロマトグラフィーにより反応物から未反応のEcoRIアダプタを除去し、L. K緩衝液(pH8. 0)を40 μ lとT4ポリヌクレオチドキナーゼを80単位加え、滅菌蒸留水で400 μ lとし、37℃で30分間インキュベートしてEcoRI切断部位をメチル化した後、フェノール/クロロホルム抽出し、抽出物をエタノール沈殿してcDNAを精製した。その後、cDNAに適量の λ gt10ファームを含むL. K緩衝液(pH8. 0)を1. 5 μ lとT4 DNAリナーゼを2. 5単位加え、滅菌蒸留水で15 μ lとし、15℃で16時間インキュベートした後、通常の生体液体分画法を適用して組換えcDNAを含むファームを得た。

【0059】

【実施例4-2 組換えDNAのクローニング】常法により、大腸菌NM514株に実施例4-1で調製したファームを感染させた後、10g/1バクテリア broth、50

5g/1バクテリア broth + ストラクト、10g/1塩化ナトリウム及び15g/1バクテリア brothを含む実地(pH7. 0)に接種し、37℃で16時間培養してプラークを形成させた。常法にしたがって、実地中にナイロン膜を載置し、約30秒間静置してプラークを移取した後、ナイロン膜を分離し、まず、0. 5N水酸化ナトリウムと1. 5M塩化ナトリウムを含む水溶液に7分間、次に、1. 5M塩化ナトリウムを含む0. 5Mリヌース緩衝液(pH7. 0)に3分間浸漬した。その後、ナイロン膜を2 \times SSCで濯ぎ、脱脂し、0. 4N水酸化ナトリウムに20分間浸漬し、5 \times SSCで濯ぎ、再度脱脂後、5 \times SSPE、5 \times テラバート液、0. 5% (w/v) SDS及び変性サケ精子DNAを含む混液に浸漬し、65℃で3時間インキュベートした。

【0060】組換えDNAをクローニングすべく、別途、アマシヤム製DNA標識キット『レディ・プライムDNA標識システム』を使用し、配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片を同位体標識してプローブ3を調製した。すなわち、1. 5ml容反応管に実施例3-5の方法により調製したDNA断片を25ngとり、滅菌蒸留水で45 μ lとし、95℃で3分間加熱した後、反応管にとり、 γ -³²P dCTP溶液を5 μ l加え、37℃で30分間インキュベートして同位体標識した。その後、同位体標識したDNA断片を含む反応物を通常の分子篩クロマトグラフィーを適用し、未反応の γ -³²Pを除去した。

【0061】次に、同位体ナイロン膜をプローブ3で洗浄し、5 \times SSPE、5 \times テラバート液、0. 5% (w/v) SDS及び変性サケ精子DNAを100 μ g/ml含む混液に浸漬し、60℃で20時間インキュベートしてハイブリダイズさせた後、室温下、6 \times SSC中で20分間、2 \times SSC中でさらに20分間インキュベートし、洗浄し、オートラジオグラフィして、プローブ3に顕著な結合を示したクローンDNAクローンを検出した。常法によりこのDNAクローンを大腸菌に増殖後、菌体からDNAを抽出し、制限酵素EcoRIで切断する一方、プラスミドベクターpUC19 (ATCC37254)を同じ制限酵素で切断し、得られたDNA断片とベクター断片を両方によりDNAリナーゼで連結して組換えDNAとした。コロニピッチ法により、この組換えDNAを大腸菌JM109株(ATCC53325)に導入してこの発明のDNAを含む生体液体を得た。

【0062】

【実施例4-3 塩基配列とアミノ酸配列の決定】実施例4-2で調製した生体液体をア. ヒ. 950 μ g/mlを含むLB broth (pH7. 2)に接種し、常法により37℃で18時間培養した。培養物を遠心分離して菌体を取り出し、通常のアルカリ SDS法を適用して組換えDNAを抽出し、その塩基配列を決定し

度計を使用する自動シーケンサにより調べたところ、配列表における配列番号6に示す塩基配列のDNAを含んでいた。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列はその配列番号6に併記したとおりであり、このことは、この発明のポリペプチドが配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有することがあり、ヒトにおいて、このアミノ酸配列が配列表における配列番号2に示す塩基配列のDNAによりコードされていることを示唆している。なお、その配列番号6においても、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。

【0063】

【実施例5 複製可能な組換えDNAと形質転換体の調製】0.5ml容反応管に2.5mM塩化マグネシウムを8 μ l、10 \times PCR緩衝液を10 μ l、1mM dNTPミックスを8 μ l、2.5単位/ μ lアンプリタックDNAポリメラーゼを0.5 μ l、実施例4-2で調製した組換えDNAを1ngとり、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列におけるN末端及びC末端付近の配列に基づき化学合成した5'-CGAGGGATCCTACTTTGGCAAGCTTG-3'及び5'-CAAGGAATTCCTAGTCTTCGTTTTCG-3'で表わされる塩基配列の2種類のオリゴヌクレオチドを、それぞれ、セムスプライマー又はアンチセムスプライマーとして過量に加え、高濃度塩水で100 μ lとした。常法により、混合物を94℃で1分間、60℃として2分間、72℃で3分間の順序でインキュベートするサイクルを40回繰り返し、得られたPCR産物を制限酵素Bam HI及びEco RIで切断してBam HI-Eco RI DNA断片を得た。このDNA断片を適量の感受性細胞に0.1 μ gとり、これに、予め制限酵素Bam HI及びEco RIで切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター「pGEX-2T」を10ng、10 \times ライクーション緩衝液を10 μ l及び適量のT4 DNAリガーゼを加え、さらに10mM ATPを最終濃度1mMまで加えた後、16℃で18時間インキュベートして、この発明による複製可能な組換えDNA「pHIGIF」を得た。

【0064】組換えDNA「pHIGIF」をコンピレントセル法により、新幹線製大腸菌DH5 α 株に導入し、得られた形質転換体「HIGIF」をアンピシリン50 μ g/mlを含むT-ブロス培地(pH7.2)に接種し、37℃で18時間振盪培養した。培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、通常のアルカリ-SDS法を適用して組換えDNA「pHIGIF」を抽出した。ゾロオキシング法により調べたところ、図2に見られるとおり、このpHIGIFにおいては、配列表における配列番号2に示す塩基配列のcDNA「HIGIF-cDNA」がTaaプロモーター及びグルタチオンS-トランスフェラーゼ遺伝子の下流に連結されていた。

【0065】

【実施例6 形質転換体によるポリペプチドの産生】実施例5で調製した形質転換体HIGIFをアンピシリン50 μ g/mlを含むT-ブロス培地(pH7.2)に接種し、振盪しながら37℃で18時間振盪培養した。次に、30l容ジャーフェーマンクに新鮮なT-ブロス培地(pH7.2)を18lずつとり、上記で得た種培養物を10 \times の量で接種し、37℃で過夜振盪培養した。培養中、培養液の一部を光路長1cmのキューベットにとり、波長650nmにおける吸光度が約1.5に達した時点でIPTGを最終濃度0.1mMまで加え、さらに5時間培養した。その後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、139mM塩化ナトリウム、7mM磷酸水素二ナトリウム及び3mM磷酸二水素ナトリウムを含む混液(pH7.2)に浮遊させ、常法により超音波処理後、菌体破砕物を遠心分離し、上清を採取した。

【0066】この上清を予め139mM塩化ナトリウム、7mM磷酸水素二ナトリウム及び3mM磷酸二水素ナトリウムを含む混液(pH7.2)で平衡化させておいたファルマシア製「グルタチオン・セファロース4B」のカラムに負荷し、新鮮な同一混液で洗浄後、カラム中のゲル1mlに対してトロンピンを100U加え、室温下で16時間静置して酵素開裂反応させた。カラムに新鮮な同一混液を通過して反応物を溶出させた後、予め新鮮な前記と同一混液で平衡化させておいたファルマシア製「スーパーストール75」のカラムに通過し、分子量18,500ダルトン付近の部分を採取した。この画分を濃縮し、凍結乾燥したところ、この発明のポリペプチドを含む固形物の乾燥物1.1gあたり約80 μ gの収量で得られた。

【0067】

【実施例7 ポリペプチドの理化的性質】

【0068】

【実施例7-1 分子量】実施例6で調製した精製ポリペプチドをユー・ケー・エムリカ「サイチャー」、第227巻、第680～685頁(1970年)に報告している方法に従い、還元剤の非存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電泳を行ったところ、分子量18,500 \pm 3,000ダルトンに相当する位置に1FN- γ 誘導活性ある主たるバンドが観察された。なお、このときの分子量マーカーは、ウーランブランクミン(67,000ダルトン)、オホシロミン(45,000ダルトン)、大腸トリカリンイ、エビラー(20,100ダルトン)及び α -ラクトグロブリン(14,400ダルトン)であった。

【0069】

【実施例7-2 等電点】精製ポリペプチドを常法にしたがってクロマトフォーカシングしたところ、4.9 \pm 1.0に等電点を示した。

【0070】

【実施例7-3 N末端アミノ酸配列】常法にしたがって、パーキン・エルマー製プロテイン・シーケンサ『473A型』を使用して分析したところ、精製ポリペプチドは、グルタチオンS-トランスフェラーゼの付加及びトロンビンによる開裂により、配列表における配列番号7に示すN末端アミノ酸配列のチロシン残基にGly-Ser-で表わされるペプチドが付加した構造を有していた。

【0071】

【実施例7-4 生物作用】

【0072】

【実施例7-4(a) マウス脾細胞におけるIFN- γ 産生の誘導】8週齢の雌C3H/HeJマウスから脾臓を摘出し、血清無含有のRPMI1640培地(pH7.4)中で分散し、新鮮な同一培地で洗浄後、ゲイ緩衝液(pH8.0)中に浸漬して溶血させた。得られた脾細胞を10%(v/v)牛胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.4)に細胞密度 1×10^6 個/mlになるように浮遊させ、口径9cmのプラスチックシャーレに10mlずつ分注し、5%CO₂インキュベータ中、37°Cで1時間培養した。シャーレ中の培養

物から浮遊細胞のみ採取し、10%(v/v)牛胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.4)で洗浄し、下記のIFN- γ 誘導試験に供した。

【0073】細胞密度 1×10^6 個/mlになるように10%(v/v)牛胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.4)に浮遊させたマウス脾細胞を96ウェルマイクロプレート上に0.15mlずつとり、精製ポリペプチドを新鮮な同一培地で適量希釈して0.05ml加えた後、2.5 μ g/mlコンカナバリンA又は50u/mlインターロイキン2を0.05ml添加するか、添加することなく5%CO₂インキュベータ中、37°Cで24時間培養した。培養後、各ウェルから培養上清を0.1mlずつ採取し、産生したIFN- γ を通常の酵素免疫法により測定した。同時に、精製ポリペプチド、コンカナバリンA及びインターロイキン2のすべて省略した以外は同一の系を設け、これを上記と同様に処置して対照とした。なお、IFN- γ の標準品には、米国国立公衆衛生研究所から入手した標準マウスIFN- γ (Gg02-901-533)を使用し、国際単位(IU)に換算して表示した。結果を表1に示す。

【0074】

【表1】

試料濃度 (μ g/ml)	マウス脾細胞におけるIFN- γ 産生(IU/ml)		
	試料のみ	試料+ コンカナバリンA	試料+ インターロイキン2
10.00	12	128	118
3.33	6	88	55
1.11	5	55	15
0.37	5	21	12
0.12	5	12	10
0.04	5	11	7
0	0	4	1

【0075】

【実施例7-4(b) ヒトリンパ球におけるIFN- γ 産生の誘導】リンパ球加温器を使用して健康者から血液を採取し、血清無含有のRPMI1640培地(pH7.4)で2倍希釈後、フィコール上に重層し、2,000rpmで20分間遠心してリンパ球を採取した。リンパ球を10%(v/v)牛胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.4)で洗浄後、リンパ球を

細胞密度 5×10^6 個/mlになるように浮遊させるとともに、IFN- γ の標準品に、米国国立公衆衛生研究所から入手した標準ヒトIFN- γ (Gg23-901-536)を使用した以外は、実施例7-4(a)と同様に試験した。結果を表2に示す。

【0076】

【表2】

試料濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ヒトリンパ球におけるIFN- γ 産生 (IU/ml)		
	試料のみ	試料 + コンカナバリンA	試料 + インターロイキン2
10.00	191	479	1,182
3.33	189	578	1,419
1.11	168	428	1,106
0.37	150	296	739
0.12	74	193	390
0.04	36	137	324
0	1	11	24

【0077】表1及び2の結果は、この発明のポリペプチドに、ヒト及びマウスを始めとする哺乳類の免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する性質のあることを裏付けている。すなわち、対照系において有意なIFN- γ 産生が認められなかったところ、この発明のポリペプチドを添加した系においては、ポリペプチド濃度

【0078】

【発明の効果】この発明は、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する新規なポリペプチドの発見に基づくものである。この発明のポリペプチドはアミノ酸配列まで解明された物質であり、免疫担当細胞において安定したIFN- γ 誘導能を発揮する。これにより、この発明のポリペプチドは、細胞培養法によりIFN- γ を製造するためのIFN- γ 誘導剤として、さらには、IFN- γ に感受性を有するウイルス性疾患、悪性腫瘍、免疫疾患一般に対する治療剤・予防剤として多種多様の用途を有することとなる。

配列

```

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp
1           5           10           15
Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr
20           25           30
Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met
35           40           45           50
Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys
55           60           65
Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu
70           75           80           85
Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe
90           95           100
Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser
105           110           115

```

【0079】この発明のポリペプチドは強力なIFN- γ 誘導能を有することから、一般に少量で所期のIFN- γ 産生を誘導でき、また、毒性が極めて低いことから、多量投与しても重篤な副作用を惹起することがない。したがって、この発明のポリペプチドは、使用に際して用量を厳密に管理しなくても、所望のIFN- γ 産生を迅速に誘導できる利点がある。

【0080】斯くも有用なるこの発明のポリペプチドは、これをコードするこの発明のDNAを利用することにより、所望量を容易に製造することができる。

【0081】この発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると云える。

【0082】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：117

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：ポリペプチド

25
Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu
120 125 130 135
Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val
140 145 150
Gln Asn Glu Asp
155

【0083】配列番号:2

配列の長さ:471

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列

TACTTTGGCA AGCTTGAATC TAAATATCA GTCATAAGAA ATTGGAATGA CCAAGTTCTC 60
TTCATTGACC AAGGAAATCG GCCTCIATTT GAAGATATGA CTGATCTGA CTGTAGAGAT 120
AATGCACCCC GGACCATATT TATTATAAGT ATGTATAAAG ATAGCCAGCC TAGAGGTATG 180
GGGTAACTA TCTCTGTGAA GTGTGAGAAA ATTTCAAYTC TCTCCTGTGA GAACAAAATT 240
ATTCCTTTA AGGAAATGAA TCCTCTGAT AACATCAAGG ATACAAAAG TGACATCATA 300
TTCTTTCAGA GAAGTGTCCC ACGACATGAT AATAAGATGC AATITGAATC TTCATCATAC 360
GAAGGATACT TTCTAGCTTG TGA AAAAGAG AGAGACCTTT TTA AACTCAT TTIGAAAAA 420
GAGGATGAAT TGGGGGATAG ATCTATAATG TTCCTGTTC AAACGAAGA C 471

【0084】配列番号:3

配列の長さ:471

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

配列の特徴

20 起源

生物名:マウス

組織の種類:肝臓

配列の特徴

配列を表わす記号:mat peptide

存在位置:1..471

特徴を決定した方法:S

配列

AAC TTT GGC CGA CTT CAC TGT ACA ACC GCA GTA ATA CGG AAT ATA AAT 43
Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
1 5 10 15
GAC CAA GTT CTC TTC GTT GAC AAA AGA CAG CCG GTG TTC GAG GAT AIG 96
Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
20 25 30
ACG GAT ATT GAT CAA AGT GCC AGT GAA CUC CAG ACC AGA CTG ATA ATA 144
Ihr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
35 40 45
TAC ATG TAC AAA GAC AGT GAA GTA AGA GGA CTG CCT GTG ACC CTC TCT 192
Iyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
50 55 60
GTG AAG GAT AGT AAA AYG TCT ACC CTC TCC TGT AAG AAC AAG ATC ATT 240
Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
65 70 75 80
TCC TTT GAG GAA ATG GAT CCA CCT GAA AAT ATT GAT GAT ATA CAA AAT 288
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
85 90 95
GAT CTC ATA TTC TTT CAG AAA CGT GTT CCA GGA CAG AAC AAG ATG GAG 336
Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
100 105 110
TTT GAA TCT TCA CTG TAT GAA GGA CAC TTT CTT GCT TGC CAA AAG GAA 384
Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu

27

28

115 120 125
 GAT GAT GCT TTC AAA CTC ATT CTG AAA AAA AAG GAT GAA AAT GGG GAT 432
 Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp
 130 135 140
 AAA TCT GTA ATG TTC ACT CTC ACT AAC TTA CAT CAA AGT 471
 Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
 145 150 155

【0085】配列番号:4

トポロジー:直鎖状

配列の長さ:25

配列の種類:ペプチド

配列の型:アミノ酸

10 フラグメント型:中間部フラグメント

配列

Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln
 1 5 10 15
 Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys
 20 25

【0086】配列番号:5

トポロジー:直鎖状

配列の長さ:18

配列の種類:ペプチド

配列の型:アミノ酸

フラグメント型:中間部フラグメント

配列

Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro
 1 5 10 15
 Gln

【0087】配列番号:6

特徴を表わす記号:5'UTR

配列の長さ:1120

存在位置:1..177

配列の型:核酸

特徴を決定した方法:S

鎖の数:二本鎖

特徴を表わす記号:leader peptide

トポロジー:直鎖状

存在位置:178..285

配列の種類:cDNA to mRNA

特徴を決定した方法:S

ハイボセティカル配列:No

特徴を表わす記号:mat peptide

アンチセンス:No

30 存在位置:286..756

起原

特徴を決定した方法:S

生物名:ヒト

特徴を表わす記号:3'UTR

組織の種類:肝臓

存在位置:757..1120

配列の特徴

特徴を決定した方法:S

配列

GCCTGGACAG TCAGCAAGGA ATGTCTCC AGTGCATTTT GCCCTCTGG CTGCCAATTC 60
 TGGCTGCTAA AGCGGCTGCC ACCTGCTCCA GTCTACACAG CTTCGGGAAG AGGAAAGGAA 120
 CCTCAGACCT TCCAGATCGC TTCCTCTGCG AACAAA TAT TTGTCCGAGG AATAAAG 177
 ATG GCT GCT GAA CCA GTA GAA GAC AAT TGC ATC AAC TTT GTG GCA ATG 225
 Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met
 1 5 10 15
 AAA TTT ATT GAC AAT ACG CTT TAC TTT ATA GGT GAA GAT GAT GAA AAC 273
 Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn
 20 25 30
 CTG GAA TCA GAT TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA 321
 Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile
 35 40 45
 AGA AAT TIG AAT GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT 369
 Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro
 50 55 60

29 30
 CTA TTT GAA GAT ATG ACT GAT TCT GAC TGT AGA GAT AAT GCA CCC CGG 417
 Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg
 65 70 75 80
 ACC ATA TTT ATT ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG 465
 Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met
 85 90 95
 GCT GTA ACT ATC TCT GTG AAG TGT GAG AAA AIT TCA AYT CTC TCC TGT 513
 Ala Val Irr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Asn Leu Ser Cys
 100 105 110
 GAG AAC AAA ATT ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC 561
 Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile
 115 120 125
 AAG GAT ACA AAA AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA 609
 Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly
 130 135 140
 CAT GAT AAT AAG ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT 657
 His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe
 145 150 155 160
 CTA GCT TGT GAA AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA 705
 Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys
 165 170 175
 GAG GAT CAA TTG GGG GAT AGA TCT ATA AIG TTC ACT GTT CAA AAC GAA 753
 Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu
 180 185 190
 CAC TAC TCA TTA AAA TTT ATG CCG GCG CAG TGG CTCA CGCCT TAA T CCCAGCCTT 812
 Asp
 TGGGAGGCTG AGGCGGGCAG ATCACCAGAG GTCACCTGTT CAAGACCAGG CTGACCAACA 872
 TGGTGAACCC TCATCTCTAC TAAAAATAT TAAAAATTAGC TTAGGTAGT GACGCATGCC 932
 CTCATCCCA GCTACTCAAG AGGCTGAGGC AGGAGAATCA CTGCACTCC GGAGGTAGAG 992
 GTTGTGGTGA GCCGAGATTG CACCATTCG CTCAGGCTG GGCAGCAACA GCAAAACTCC 1052
 ATCTCAAAAA ATAAAAATAA TAAATAAACA AATAAAAAAT TCATAATG G AAAAAAATA 1112
 AAAAAA 1120

【0088】配列番号:7

配列の長さ:10

配列の型:アミノ酸

配列

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser

1

5

10

【図面の簡単な説明】

【図1】マウス肝細胞由来の蛋白質をトリプシン消化し、
 得られるペプチド断片の高速液体クロマトグラフィー
 における溶出パターンを示す図である。

【図2】この発明による組換えDNAであるpHIGIF
 の構造を示す図である。

【符号の説明】

HIGIF cDNA

この発明のポリペプチド

トポロジー:直線状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:N末端フラグメント

をコードするcDNA

P t a c

GST

スフェラーゼ遺伝子

Amp^R

ori

点

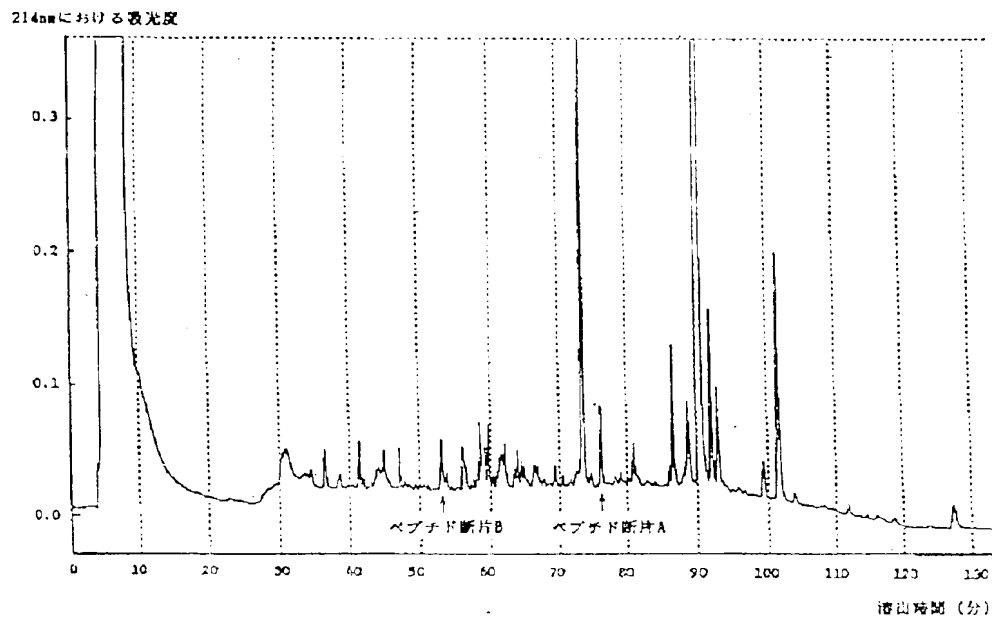
t a cプロモータ

グルタチオンS-トラン

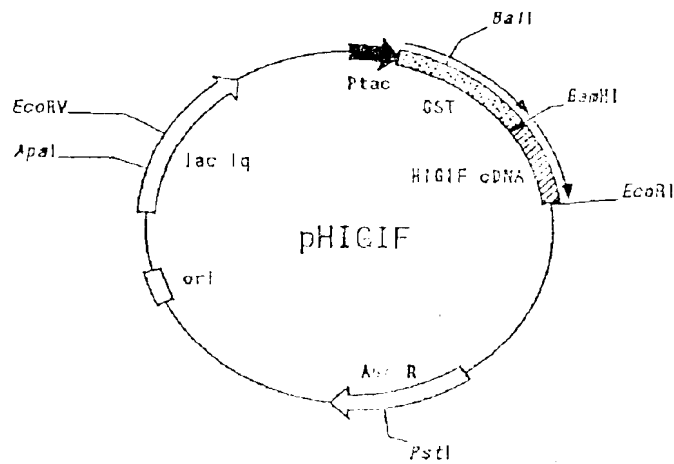
アンピシリン耐性遺伝子

大腸菌における複製開始

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.

// A61K 38/00

C07K 7/06

7/08

(C12N 1/21

C12K 1/19)

(C12P 21/00

C12R 1/19)

識別記号

AED

府内整理番号

F I

技術表示箇所

(18)

特開平8-193098

9162-4B

C12N 15/00

ZNA A

A61K 37/02

AED

[Document name] Specification

[Title of the Invention] Interferon- γ production inducing
polypeptide

[Claims] 1. A polypeptide which has the amino acid sequence in
SEQ ID NO:1 (where the symbol "Xaa" means "isoleucine" or
"threonine") or a homologous amino acid sequence thereunto, and
which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells.

2. A DNA which encodes the polypeptide as claimed in
claim 1 or 2.

3. The DNA as claimed in claim 2, which contains the
base sequence in SEQ ID NO:2, a homologous base sequence
thereunto, or a complementary base sequence to these base
sequences.

4. The DNA as claimed in claim 2 or 3, wherein one or
more bases in SEQ ID NO:2 are replaced with other bases by means
of the degeneracy of genetic code without alternating the amino
acid sequence in SEQ ID NO:1.

5. The DNA as claimed in claim 2, 3 or 4, which has
the base sequence in SEQ ID NO:6 (where the symbol "Xaa" means
"isoleucine" or "threonine").

6. The DNA as claimed in any one of claims 2 to 5,
which is derived from human.

7. A replicable recombinant DNA, which contains a
self-replicable vector and a DNA encoding the polypeptide of claim
1.

8. The replicable recombinant DNA as claimed in claim
7, which contains the base sequence in SEQ ID NO:2, a homologous
base sequence thereunto, or a complementary base sequence to these
base sequences.

9. The replicable recombinant DNA as claimed in claim 7 or 8, wherein one or more bases in SEQ ID NO:2 are replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence in SEQ ID NO:1.

10. The replicable recombinant DNA as claimed in claim 7, 8 or 9, which contains the base sequence in SEQ ID NO:6 (where the symbol "Xaa" means "isoleucine" or "threonine").

11. The replicable recombinant DNA as claimed in any one of claims 7 to 10, wherein said DNA is derived from human.

12. The replicable recombinant DNA as claimed in any one of claims 7 to 11, wherein said vector is a plasmid vector.

13. A transformant obtainable by introducing into an appropriate host a replicable recombinant DNA which contains a self-replicable vector and a DNA encoding the polypeptide of claim 1.

14. The transformant as claimed in claim 13, which contains the base sequence in SEQ ID NO:2, a homologous base sequence thereunto, or a complementary base sequence to these base sequences.

15. The transformant as claimed in claim 13 or 14, wherein one or more bases in SEQ ID NO:2 are replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence in SEQ ID NO:1.

16. The transformant as claimed in claim 13, 14 or 15, which contains the base sequence in SEQ ID NO:6 (where the symbol "Xaa" means "isoleucine" or "threonine").

17. The transformant as claimed in any one of claims 13 to 16, wherein said DNA is derived from human.

18. The transformant as claimed in any one of claims

13 to 17, wherein said vector is a plasmid vector.

19. The transformant as claimed in any one of claims 13 to 18, wherein said host is a microorganism of the species *Escherichia coli*.

20. A process for preparing a polypeptide, which comprises (a) culturing in a nutrient culture medium a transformant capable of forming the polypeptide of claim 1, prepared by introducing into a host a replicable recombinant DNA containing a self-replicable vector and a DNA encoding the polypeptide, and (b) collecting the formed polypeptide from the resultant culture.

21. The process as claimed in claim 20, wherein said DNA has the base sequence in SEQ ID NO:2, a homologous base sequence thereunto, or a complementary base sequence to these base sequences.

22. The process as claimed in claim 20 or 21, wherein one or more bases in SEQ ID NO:2 are replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence in SEQ ID NO:1.

23. The process as claimed in claim 20, 21 or 22, wherein said DNA has the base sequence in SEQ ID NO:6 (where the symbol "Xaa" means "isoleucine" or "threonine")

24. The process as claimed in any one of claims 20 to 23, wherein said DNA is derived from human.

25. The process as claimed in any one of claim 20 to 24, wherein said vector is a plasmid vector.

26. The process as claimed in any one of claims 20 to 25, wherein said host is a microorganism of the species *Escherichia coli*.

27. The process as claimed in any one of claims 20 to 26, wherein the formed polypeptide is purified by concentration, salting out, dialysis, separatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, hydrophobic chromatography, affinity chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis, and/or isoelectric point electrophoresis.

[Detailed Description of the Invention]

[Field of the Invention]

The present invention relates to a novel polypeptide which induces the interferon- γ (hereinafter abbreviated as "IFN- γ ") production by immunocompetent cells.

[Prior Art]

It has been said that IFN- γ is a protein which has antiviral-, antioncotic- and immunoregulatory-activities, and is produced by immunocompetent cells stimulated with antigens or mitogens. Because of these biological activities, IFN- γ has been expected for use as an antitumor agent from the beginning of the finding, and studied energetically on clinical trials as a therapeutic agent for malignant tumors in general including brain tumors. IFN- γ preparations now commercially available are roughly classified into 2 groups, i.e. natural IFN- γ s produced by immunocompetent cells and recombinant IFN- γ s produced by transformants prepared by introducing into microorganisms of the species *Escherichia coli* DNAs which encode the natural IFN- γ s. In the above clinical trials, either of these IFN- γ s is administered to patients as an "exogenous IFN- γ ".

Among these IFN- γ s, the natural IFN- γ s are usually produced by culturing established immunocompetent cells in nutrient culture media supplemented with IFN- γ inducers to form

the IFN- γ s, and purifying the IFN- γ s. It is known that the type of IFN- γ inducers greatly influence on the IFN- γ production yield, the facilitation of the IFN- γ purification, and the safeness of the final products. Generally, mitogens such as concanavalin A (Con A), *Lens culinaris*, *Phytolacca americana*, endotoxin and lipopolysaccharide are used. These mitogens, however, have problems of their molecular- and quality varieties depending on their origins and purification methods, as well as difficulty of yielding in a desired amount and in a constant IFN- γ inducibility. In addition, most of these mitogens induce unfavorable side effects when administered to living bodies, and some of them even show toxicity, so that it is substantially difficult to induce the IFN- γ production by directly administering such mitogens to living bodies.

[Object of the Invention]

In view of the foregoing, the object of the present invention is to provide a novel polypeptide which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells.

It is another object of the present invention to provide a DNA encoding the polypeptide.

It is further object of the present invention to provide a replicable recombinant DNA which contains the DNA and a self-replicable vector.

It is yet another object of the present invention to provide a transformant obtainable by introducing the recombinant DNA into an appropriate host.

It is another object of the present invention to provide a process for preparing the polypeptide by using the transformant.

[Means to Attain the Object]

The first object of the present invention is attained by a polypeptide which has the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 or a homologous amino acid sequence thereunto.

The second object of the present invention is attained by a DNA which encodes the polypeptide.

The third object of the present invention is attained by a replicable recombinant DNA which contains the DNA and a self-replicable vector.

The fourth object of the present invention is attained by a transformant obtainable by introducing the replicable recombinant DNA into an appropriate host.

The fifth object of the present invention is attained by a process for preparing the protein comprising introducing the recombinant DNA into a host, culturing the transformant in a nutrient culture medium, and collecting the formed protein from the resultant culture.

[Function]

As is described above, the polypeptide according to the present invention has an amino acid sequence which differs from those of conventional polypeptides, and induces the IFN- γ production when allowed to act on immunocompetent cells.

The DNA according to the present invention expresses the production of the present polypeptide by introducing the DNA into a self-replicable vector to form a recombinant DNA, and, usually, introducing the recombinant DNA into a host capable of proliferating without difficulty but incapable of producing the present polypeptide.

Generally, the replicable recombinant DNA according to the present invention expresses the production of the present

polypeptide by introducing it into a host capable of proliferating without difficulty but incapable of producing the present polypeptide.

The transformant produces the polypeptide when cultured.

The present polypeptide is readily obtained in a desired amount by culturing the transformant according to the present process.

The present invention is based on the finding of a novel polypeptide which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. During the study on cytokines produced from mammalian cells, the present inventors found there exists in mouse liver a novel protein capable of inducing the IFN- γ production. They isolated the protein by using two or more purification methods comprising column chromatography as a main technique and determined for partial amino acid sequence. Based on the above partial amino acid sequence, they chemically synthesized a primer by using as a template a mRNA isolated from mouse liver cells, and treated the protein with transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the presence of the primer to collect DNA fragments which partially encode the protein. By using the DNA fragments as a probe, they energetically studied a cDNA library which was alternatively prepared from the mRNA to obtain a DNA fragment consisting of 471 base pairs and having the base sequence of SEQ ID NO:3. The decoding of the base sequence revealed that the protein isolated from mouse liver consists of 157 amino acids and has an amino acid sequence in SEQ ID NO:3, where the symbol "Xaa" means "methionine" or "threonine".

Based on these findings, the present inventors further studied the mRNA derived from human liver cells, and have found

that there exists a new gene which encodes a polypeptide which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. The gene contains the base sequence in SEQ ID NO:2, and the decoding thereof revealed that it encodes a polypeptide which consists of 157 amino acids and has the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 where the symbol "Xaa" means "isoleucine" or "threonine".

The techniques used to reveal the amino acid sequence and the base sequences in SEQ ID NOs:1 and 2 are summarized in the below:

- (1) A protein, which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells, was isolated from mouse liver cells and highly purified by combining conventional purification methods comprising chromatography as a main technique;
- (2) The resultant purified protein was digested with trypsin, and 2 polypeptide fragments were isolated from the resultant mixture and determined for amino acid sequence;
- (3) From mouse liver cells, a mRNA was collected and subjected as a template to the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to obtain DNA fragments in the presence of an oligonucleotide as a primer, which had been chemically synthesized based on the above partial amino acid sequence. The DNA fragments were screened by using an oligonucleotide as a probe which had been chemically synthesized based on these partial amino acid sequences, followed by collecting a DNA fragment which partially encodes

the protein;

- (4) A cDNA library was labeled and hybridized with the resultant cDNA library prepared with the mRNA as a template, followed by selecting a transformant which exhibited a strong hybridization;
- (5) A cDNA was isolated from the transformant, and the base sequence was determined and decoded. The comparison of the decoded amino acid sequence and the partial amino acid sequence revealed that the protein has the amino acid sequence in SEQ ID NO:3, and, in mice, the base sequence in SEQ ID NO:3 encodes the amino acid sequence;
- (6) A DNA fragment having the base sequence in SEQ ID NO:3 was prepared, labeled and hybridized with a cDNA library which had been prepared by using as a template mRNA derived from human liver cells, followed by selecting a transformant which exhibited a strong hybridization; and
- (7) The cDNA was prepared from the transformant, determined for base sequence and decoded, revealing that the present polypeptide includes those with the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 which is encoded by the base sequence in SEQ ID NO:2 in human.

Through a long term research, the present inventors have found the present polypeptide which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells, and, as is evident from SEQ ID NO:1, which differs from conventionally known polypeptides. The present polypeptide includes natural and recombinant polypeptides as long

as they have the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 or homologous ones thereunto. Variants, which have homologous amino acid sequences to the one in SEQ ID NO:1, can be obtained by replacing one or more amino acids in SEQ ID NO:1 with other amino acids without alternating the inherent biological activity of the present polypeptide. Depending on hosts into which DNAs, even when used the same DNAs, are introduced and on the components and the conditions of cultivation temperature and pH for transformants containing the DNA, it may be formed variants which lack one or more amino acids near to the N- and/or C-termini in SEQ ID NO:1, or additionally contain one or more amino acids near to the N-termini in SEQ ID NO:1 through the modification of internal enzymes of the hosts after the DNA expression, while keeping the inherent biological properties of the polypeptide. The present polypeptide includes such variants as long as they induce the IFN- γ production by immunocompetent cells.

The present polypeptide can be prepared by culturing in nutrient culture media transformants which contain DNAs encoding the polypeptide, and collecting the formed polypeptide from the resultant cultures. The transformants usable in the present invention can be obtained by, for example, introducing into hosts DNAs having the base sequence in SEQ ID NO:2, homologous base sequences thereunto, and complementary ones to these base sequences. One or more bases in those base sequences can be replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence of the present polypeptide. To express the production of the polypeptide in hosts by using such DNAs, one or more bases in base sequences which encode the present polypeptide or its variants can be

replaced with other bases.

Any DNA can be used in the present invention as long as it has one of those base sequences independently of their origin, i.e. those from natural sources or artificially synthesized ones. The natural sources include, for example, human liver cells from which the gene, containing the DNA with the base sequence in SEQ ID NO:6, is obtainable. The preparation procedure is as follows: Fractionate a commercially available human liver mRNA supplemented with poly(A) on sucrose gradient buffer to isolate the purified mRNA. Allow a reverse transcriptase and a polymerase to act on the mRNA as a template to form double-stranded cDNA, introduce the cDNA into an appropriate self-replicable vector, and introduce the resultant recombinant DNA into an appropriate host such as *Escherichia coli*. Culture the resultant transformant in a nutrient culture medium, and collect the proliferated transformants containing the DNA encoding the present polypeptide by the colony hybridization method. The DNA according to the present invention is obtainable by treating the transformants with conventional methods. To artificially produce the present DNA, for example, it is prepared by the chemical synthesis based on the base sequence in SEQ ID NO:2, or by introducing a DNA which encodes the amino acid sequence in SEQ ID NO:1 into an appropriate vector to form a recombinant DNA, introducing the recombinant DNA into an appropriate host, culturing the resultant transformant in a nutrient culture medium, isolating the proliferated cells from the culture, and collecting plasmids containing the objective DNA from the cells.

Generally, the DNA was introduced into hosts in the form of a recombinant DNA. Such a recombinant DNA usually contains the

DNA and a self-replicable vector, and it can be readily prepared by recombinant DNA technology in general if only the DNA is in hand. Examples of such self-replicable vector are plasmid vectors such as pKK223-2, pGEX-2P, pRL- λ , pBTrp2 DNA, pUB110, YEpl3, Ti plasmid, Ri plasmid and pBI121. Among these vectors, pKK223-2, pGEX-2T, pRL- λ , pBTrp2 DNA, pUB110 and YEpl3 are suitably used when the present DNA is expressed in procaryotes such as yeasts and other microorganisms of the species *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, while Ti plasmid, Ri plasmid and pBI121 are suitably used for the expression in animal and plant cells.

To introduce the present DNA into these vectors, conventional methods used in this field can be arbitrarily used: Genes containing the present DNA and self-replicable vectors are cleaved with restriction enzymes and/or ultrasonic, and the resultant DNA fragments and vector fragments are ligated. To cleave genes and vectors, the use of restriction enzymes, which specifically act on nucleotides, more particularly, type II restriction enzymes such as *Sau* 3AI, *Eco* RI, *Hind* III, *Bam* HI, *Sal* I, *Xba* I, *Sac* I and *Pst* I, facilitates the ligation of DNA fragments and vector fragments. To ligate DNA fragments and vector fragments, they are, if necessary, first annealed, then treated with a DNA ligase *in vivo* or *in vitro*. The recombinant DNAs thus obtained can be readily introduced into appropriate hosts, and this enables the limitless replication of the DNAs by culturing the transformants.

The recombinant DNAs usable in the present invention can be introduced into appropriate hosts such as yeasts and other microorganisms of the species *Escherichia coli* and *Bacillus*

subtilis: When microorganisms of the species *Escherichia coli* are used as a host, they are cultured in the presence of the recombinant DNAs and calcium ions, and the competent cell method and the protoplast method are used when microorganisms of the species *Bacillus subtilis* are used as a host. To clone the objective transformants, they are selected by the colony hybridization method or by culturing all the transformants in nutrient culture media, and selecting those which produce polypeptides capable of inducing the IFN- γ production by immunocompetent cells.

The transformants thus obtained produce the present polypeptide intracellularly or extracellularly when cultured in nutrient culture media. Examples of such nutrient culture media are those in the form of liquid in general which contain carbon sources, nitrogen sources and minerals, as well as amino acids and/or vitamins as a micronutrient. The carbon sources usable in the present invention include saccharides such as starch, starch hydrolysates, glucose, fructose and sucrose. The nitrogen sources usable in the present invention include nitrogen containing organic- and inorganic-compounds such as ammonia and their salts, urea, nitrates, peptone, yeast extract, defatted soy bean, corn steep liquor, and beef extract. Transformants are inoculated into nutrient culture media and incubated at a temperature of 25-65°C and at a pH of 5-8 for about 1-10 days under aerobic conditions by the agitation-aeration method, etc., to obtain cultures containing the present polypeptide. Although the cultures can be used intact as an IFN- γ inducer, they are, if necessary, subjected to ultrasonication and/or cell lysis enzymes to disrupt cells, followed by filtering or centrifuging the resultant suspensions

to remove intact cells and cell debris, and further purifying the resultant supernatants containing the present polypeptide. The purification methods usable in the present invention are, for example, those which are generally used in this field to purify biologically active substances, i.e. concentration, salting out, dialysis, separatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, hydrophobic chromatography, affinity chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis, and isoelectrophoresis, and, if necessary, two or more of them can be used in combination. The resultant purified solutions containing the present polypeptide can be concentrated and/or lyophilized into liquids or solids to meet to final uses.

As is described above, the present polypeptide has an activity of inducing IFN- γ production by immunocompetent cells. Because of this, the present polypeptide can be arbitrarily used as therapeutic and/or prophylactic agents, for example, those for virus diseases such as AIDS and condyloma acuminatum; malignant tumors such as renal cancer, granuloma, mycosis fungoides and cerebral tumor; and immune disorders such as articular rheumatism and allergy.

The present polypeptide is allowed to coexist in nutrient culture media to induce the IFN- γ production by immunocompetent cells, or directly administered to mammals for the treatment and/or the prevention of IFN- γ susceptible diseases. In the former, leukocytes separated from peripheral blood of mammals, or established immunocompetent cells such as HBL-38 cells, Mo cells, Jurkat cells, HuT78 cells, EL4 cells and LL2-R4 cells are suspended in nutrient culture media containing the present polypeptide to induce the IFN- γ production. If necessary, such

nutrient culture media can be supplemented with T-cell stimulants such as mitogen, interleukin 2, and anti-CD 3 antibody, and the cells are cultured at a temperature of about 30-40°C and at a pH of about 5-8 for about 1-100 hours while the media were replacing with fresh ones. IFN- γ can be obtained from the resultant cultures by one or more conventional methods generally used for purifying biologically active substances, for example, concentration, salting out, dialysis, separatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis, and isoelectrophoresis.

To treat and/or prevent IFN- γ susceptible diseases, the present IFN- γ inducing agent is directly administered to mammals: For example, IFN- γ inducing agents are orally administered to mammals after formulated into appropriate forms, or injected to the mammals intradermally, subcutaneously, muscularly, intravenously and peritoneally. The mammals, which can be administered with the present polypeptide, are not restricted to human, and include other animals such as mouse, rat, hamster, rabbit, dog, cat, cow, horse, goat, sheep, pig and monkey. Since the present polypeptide has a strong IFN- γ inducibility and an extremely-low toxicity, it readily induces the IFN- γ production with only a small amount without causing serious side effects even when administered to the mammals in a relatively-high dose. Thus, the present polypeptide advantageously induces a desired amount of IFN- γ smoothly without strictly controlling the dose level. It goes without saying that the present polypeptide fulfills the safeness required for as a pharmaceutical.

The present invention will be explained with reference to the following Examples, and the techniques used therein are in

themselves conventionally known in the art: For example, those disclosed by J. Sambrook et al. in "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2nd edition (1989), published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, and by Masami MURAMATSU in "Rabo-Manual for Genetic Technology" (1988), published by Maruzen Co., Ltd., Tokyo, Japan.

Example 1

Preparation of purified polypeptide

To 600 female CD-1 mice, 8-week-old, was intraperitoneally injected one mg/mouse of dead *Corynebacterium parvum* (ATCC 11827) which had been preheated at 60°C for one hour, and the mice were fed in usual manner for 7 days and intravenously injected with one µg/mouse of a purified lipopolysaccharide derived from *Escherichia coli*. On 1-2 hours after the intravenous injection, the mice were sacrificed to collect their blood, followed by removing their livers, disrupting the livers with a homogenizer in 8-fold volumes of 50 mM phosphate buffer (pH 7.3), and extracting the resultant suspension. The resultant extract was centrifuged at about 8,000 rpm for 20 min, and an about 9 L of the supernatant was admixed with a saturated ammonium sulfate in 50 mM phosphate buffer (pH 7.3) to give a saturation degree of 45 w/v %. The resultant solution was allowed to stand at 4°C for 18 hours and centrifuged at about 8,000 rpm for 30 min to obtain an about 19 L supernatant containing the present polypeptide.

The supernatant was fed to a column packed with about 4.6 L of "PHENYL SEPHAROSE", a product of Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala Sweden, which had been equilibrated with 50 mM phosphate buffer (pH 7.3) containing one M ammonium sulfate,

and the column was washed with a fresh preparation of the same buffer, and fed at an SV (space velocity) 0.57 with a linear gradient buffer ranging from 1 M to 0.2 M ammonium sulfate in 50 mM phosphate buffer (pH 7.3). Fractions containing the present polypeptide eluted at 0.8 M ammonium sulfate were collected and pooled into an about 4.8 L solution which was then concentrated with a membrane filter, dialyzed against 20 mM phosphate buffer (pH 6.5) at 4°C for 18 hours, and fed to a column packed with about 250 ml of "DEAE-SEPHAROSE", a product of Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden. The column was washed with a fresh preparation of the same buffer and fed at an SV 1.2 with a linear gradient buffer ranging from 0 M to 0.2 M sodium chloride in 20 mM phosphate buffer (pH 6.5) to elute and collect about 260 ml fractions containing the present polypeptide eluted at a concentration of about 0.13 M sodium chloride.

Fractions containing the present polypeptide were collected, pooled, concentrated and dialyzed against 25 mM Bis-Tris buffer (pH 7.1) at 4°C for 18 hours. The dialyzed solution was applied to a column packed with about 24 ml of "MONO-P", a product of Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, and eluted with 10 v/v % polybuffer 74 (pH 4.0) while decreasing the pH from 7 to 4 to obtain an about 23 ml eluate containing the present polypeptide. The eluate was concentrated, fed to a column packed with "SUPER-DEX 75", a product of Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, which had been equilibrated with a mixture solution (pH 7.2) containing 7 mM disodium hydrogen phosphate, 3 mM sodium dihydrogen phosphate, and 139 mM sodium chloride, and subjected to gel filtration chromatography to elute fractions, containing the present polypeptide at around 19,000

daltons, with a fresh preparation of the same solution. The fractions were pooled and concentrated for use in Example 2. The yield of the present polypeptide was about 0.6 µg/mouse.

Example 2

Partial amino acid sequence

A portion of an aqueous solution containing the purified polypeptide in Example 1 was concentrated up to a volume of about 50 µl which was then admixed with 25 µl of a solution containing 3 w/v % SDS, 60 v/v % glycerol, and 60 mg/ml dithiothreitol. The resultant mixture was incubated at 50°C for 30 min, positioned on 15 w/v % polyacrylamide gel, and electrophoresed in usual manner. The resultant gel was stained by soaking it in a mixture solution of 10 v/v % aqueous acetic acid solution and 50 v/v % aqueous methanol containing 0.1 w/v % coomassie brilliant blue R 250, destained by repeatedly washing the gel with a mixture solution of 12 v/v % aqueous methanol and 7 v/v % aqueous acetic acid solution, and washed by soaking it in distilled water for 18 hours. A portion of the gel, which was stained with the coomassie brilliant blue and contained the present polypeptide, was cut out of the gel, and lyophilized.

The lyophilized gel was soaked in 0.6 ml solution consisting of 100 mM sodium hydrogen carbonate containing 2 µg/ml "TPCK TRYPSIN", 0.5 mM calcium chloride, and 0.02 v/v % aqueous Tween 20 solution, followed by the incubation at 37°C for 18 hours to trypsinize the protein. The resultant was centrifuged to obtain a supernatant, while the resultant precipitate was soaked in one ml of one v/v % aqueous trifluoroacetate containing 0.001 v/v % Tween 20, shook for 4 hours at ambient temperature, and centrifuged to obtain a supernatant. The newly formed precipitate

was successively treated similarly as above with 70 v/v aqueous trifluoroacetate containing 0.001 v/v Tween 20 and with 50 v/v % aqueous acetonitrile to obtain a supernatant. The resultant supernatant and the already obtained supernatant in the above were pooled and concentrated up to give 250 μ l which was then centrifugally filtered.

The resultant aqueous solution containing peptide fragments was fed to "HPLC ODS-120T", a column for HPLC commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, which had been previously equilibrated with 0.1 v/v aqueous trifluoroacetate, and the column was washed with 0.1 v/v % aqueous trifluoro acetate, and fed with 0.1 v/v % trifluoro acetate at a flow rate of 0.5 ml/min while the concentration of aqueous acetonitrile was increasing from 0 v/v % to 70 v/v % and the concentration of peptide in the eluate was monitoring by a spectrophotometer at wave lengths of 214 nm and 280 nm. Fractions eluted about 75 min and about 55 min after initiating the elution were respectively collected (hereinafter named "peptide fragment A" and "peptide fragment B"). The elution pattern was in FIG.1.

The peptide fragments A and B were analyzed on "MODEL 473 A", a protein sequencer commercialized by Perkin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA, and revealed that they have the amino acid sequences in SEQ ID NOs:4 and 5.

Example 3

Base sequence of DNA encoding protein and
amino acid sequence of protein

Example 3-1

Preparation of whole RNA

Three g of wet mouse liver cells, similarly prepared by

the method in Example 1, was weighed, soaked in 20 ml of a mixture solution containing 6 M guanidine isothiocyanate, 10 mM sodium citrate, and 0.5 w/v SDS, and disrupted with a homogenizer. Thirty-five-ml centrifugation tubes were injected with 25 ml of 0.1 M EDTA (pH 7.5) containing 5.7 M cesium chloride, and 10 ml of the homogenized cell suspension was overlaid on the upper part of the solutions in the tubes, followed by centrifuging the tubes at 25,000 rpm for 20 hours to collect RNA fractions. The fractions were pooled, distributed into 15-ml centrifugation tubes, and mixed with equal volumes of a mixture solution of chloroform and isobutanol (= 4:1 by volume). The tubes were vibrated for 5 min and centrifuged at 4°C and at 10,000 rpm for 10 min, and the formed water layers were collected, pooled, mixed with 2.5-fold volumes of ethanol, and allowed to stand at -20°C for 2 hours to precipitate the whole RNAs. The precipitate was collected, pooled, washed with 75 v/v % aqueous ethanol, and dissolved in 0.5 ml of sterilized distilled water for use in Experiment 3-2. The yield of the RNAs was about 4 mg, on a dry solid basis (d.s.b.).

Example 3-2

Preparation of DNA fragments encoding partially the present polypeptide

One µg of the whole RNAs in Example 3-1 was mixed with 4 µl of 25 mM magnesium chloride, 2 µl of a solution of 10xPCR buffer consisting of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3) and 500 mM potassium chloride, 8 µl of one mM dNTP mix, one µl of a solution containing one unit/µl RNase inhibitor, one µl of a solution containing 2.5 units/µl reverse transcriptase, and one µl of 2.5 pM random hexamer, and further mixed with water to give a total

volume of 20 μ l. The mixture solution was placed in 0.5 ml reaction tubes, and, in usual manner, successively incubated at 25°C for 10 min, at 42°C for 30 min, at 99°C for 5 min, and at 5°C for 5 min to effect the reverse transcriptase reaction, followed by recovering an aqueous solution containing the first strand cDNA.

To 20 μ l of the aqueous solution were added 4 μ l of 25 mM magnesium chloride, 8 μ l of 10xPCR buffer, 0.5 μ l of a solution containing 2.5 units/ μ l of AmpliTaq DNA polymerase commercialized by Perkin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA, and one pmole each of primers 1 and 2 as a sense primer or an anti-sense primer. The mixture solution was volumed up to 100 μ l with sterilized distilled water, and, in usual manner, successively incubated at 94°C for one min, at 45°C for 2 min, at 72°C for 3 min in a cyclic manner for 40 cycles to amplify a DNA fragment, which partially encodes the present polypeptide, by using the first strand cDNA as a template. The primers 1 and 2 were oligonucleotides, which were chemically synthesized based on the amino acid sequences of Pro-Glu-Asn-Ile-Asp-Asp-Ile and Phe-Glu-Asp-Met-Thr-Asp-Ile in SEQ ID NOs:4 and 5, had the base sequences of 5'-ATRTCRTCDATRTTYTCNGG-3' and 5'-TTYGARGAYATGACNGAYAT-3'.

A portion of the resultant PCR product was fractionated on electrophoresis in 2 w/v % agarose gel, transferred on a nylon film, fixed with 0.4 N sodium hydroxide, washed with 2xSSC, air-dried, soaked in a prehybridization solution containing 5xSSPE, 5xDenhard's solution, 0.5 w/v % SDS and 100 μ g/ml of denatured salmon sperm DNA, and incubated at 65°C for 3 hours. An oligonucleotide as a probe 1 having a base sequence of 5'-TTYGARGARATGGAYCC-3' was synthesized based on the amino acid

sequence of Phe-Glu-Glu-Met-Asp-Pro in SEQ ID NO:4, and labeled with [γ - 32 P]ATP and T4 polynucleotide kinase. The nylon film was soaked in a solution containing one pmole of the probe 1, 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 μ g/ml of a denatured salmon sperm DNA, and incubated at 45°C for 24 hours to effect hybridization. The resultant nylon film was washed with 6xSSC and autoradiographed in usual manner and revealed that the PCR product contained the objective DNA fragment.

The remaining PCR product was mixed with 50 ng of "pT7 BLUE T", a plasmid vector commercialized by Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan, an adequate amount of T4 ligase, and further mixed with 100 mM ATP up to give a concentration of one mM, followed by the incubation at 16°C for 18 hours to insert the DNA fragment into the plasmid vector. The recombinant DNA thus obtained was introduced into *Escherichia coli* NoVa Blue strain, a microorganism of the species *Escherichia coli* commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, to obtain a transformant which was then inoculated into a medium plate containing 10 g/l bactotryptone, 2.5 g/l sodium chloride, 15 g/l bacto-agar, 100 mg/l ampicillin, 40 mg/l X-Gal and 23.8 mg/l isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside (hereinafter abbreviated as "IPTG"), and incubated at 37°C for 24 hours to form colonies. A nylon film was in usual manner overlaid on a medium plate and allowed to stand for about 30 seconds to attach the colonies thereunto. The nylon film was then detached from the plate and soaked for 7 min in a solution containing 0.5 N sodium hydroxide and 1.5 M sodium chloride to effect cell lysis. Thereafter, the nylon film was further soaked for 3 min in 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 1.5 M sodium chloride, washed with 2xSSC,

soaked in 0.4 N sodium hydroxide for 20 min to fix the DNA, washed with 5xSSC, air-dried, soaked in a prehybridization solution containing 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA, and incubated at 65°C for 3 hours. The colonies formed on the nylon film were in usual manner hybridized with the probe 1, washed with 6xSSC, and autoradiographed similarly as above, followed by selecting transformants which strongly hybridized with the probe 1.

The transformants were inoculated in L-broth (pH 7.2) containing 100 µg/ml ampicillin and incubated at 37°C for 18 hours, followed by collecting cells from the culture and collecting recombinant DNA by conventional alkali-SDS method. The analysis of the dideoxy method revealed that the recombinant DNA contained a DNA fragment which consists of base sequences corresponding to those positioning from 85 to 281 in SEQ ID NO:3.

Example 3-3

Preparation of mRNA

0.05 ml of an aqueous solution containing the whole RNAs in Example 3-1 was placed in a test tube, admixed with 0.5 ml of 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing one mM EDTA and 0.1 w/v % SDS, and volumed up to one ml with sterilized distilled water. To the mixture was added one ml "OLIGOTEX-dT30 SUPER", an oligo-d(T)₃₀ latex commercialized by Nippon Roche K.K., Tokyo, Japan, followed by the incubation at 65°C for 5 min to denature the RNAs and the cooling for 3 min in an ice-chilled bath. The resultant mixture was admixed with 0.2 ml of 5 M sodium chloride, incubated at 37°C for 10 min, and centrifuged at 10,000 rpm at 25°C for 10 min. The precipitate in the form of a pellet was suspended in 0.5 ml sterilized distilled water, and incubated at 65°C for 5 min to

extract mRNA from the oligo-d(T)₃₀ latex. The yield of the mRNA was about 5 µg.

Example 3-4

Preparation of cDNA library

cDNA Library was prepared from the mRNA in Example 3-3 by using "cDNA SYNTHESIZING SYSTEM PLUS", a cDNA cloning kit commercialized by Amersham Corp., Div., Amersham International, Arlington Heights, USA. The procedures were as follows: To 1.5-ml reaction tube were successively added 4 µl of a solution for synthesizing the first strand cDNA, one µl sodium pyrophosphate solution, one µl of a solution of human placenta ribonuclease inhibitor, 2 µl deoxynucleoside triphosphate mix, and one µl oligo-dT primer. The resultant mixture was mixed with 2 µl of mRNA in Experiment 3-3, volumed up to 19 µl with sterilized distilled water, mixed with one µl of a solution containing 20 units of reverse transcriptase, and incubated at 42°C for 40 min to obtain a reaction mixture containing the first strand cDNA.

The mixture thus obtained was mixed with 37.5 µl of a solution for synthesizing the second strand cDNA, 0.8 units of ribonuclease H derived from *Escherichia coli*, 23 units of DNA polymerase, and volumed up to 100 µl with sterilized distilled water. The resultant mixture was successively incubated at 12°C for 60 min and at 22°C for 60 min, mixed with 2 units of T4 DNA polymerase, and incubated at 37°C for 10 min to obtain a reaction mixture containing the second strand cDNA. To the reaction mixture was added 4 µl of 0.25 M EDTA (pH 8.0) to suspend the reaction, and the resultant mixture was in usual manner extracted with phenol and chloroform and treated with ethanol to precipitate the objective cDNA, followed by recovering the precipitate.

To the cDNA thus obtained were added 2 μ l of L/K buffer, 250 pmole Eco RI adaptor, and 2.5 units of T4 DNA ligase in this order, and the resultant solution was volumed up to 20 μ l with sterilized distilled water, and incubated at 15°C for 16 hours to ligate the Eco RI adaptor to the both ends of the cDNA. The reaction mixture was mixed with 2 μ l of 0.25 M EDTA to inactivate the remaining enzyme, and subjected to molecular sieve chromatography to remove intact Eco RI adaptor. To the resultant were added 40 μ l of L/K buffer, 80 units of T4 polynucleotide kinase, and the mixture was volumed up to 400 μ l with sterilized distilled water, followed by the incubation at 37°C for 30 min to methylate the Eco RI cleavage sites. The resultant mixture was extracted with phenol and chloroform and treated with ethanol to precipitate the objective DNA, followed by recovering the DNA. To the DNA were added 1.5 μ l of L/K buffer containing an adequate amount of λ gt 10 arms, and 2.5 units of T4 DNA ligase, and the resultant solution was volumed up to 15 μ l with sterilized distilled water, incubated at 15°C for 16 hours to effect ligation, and subjected to conventional *in vitro* packaging method to obtain a phage containing a recombinant λ DNA.

Example 3-5

Cloning of recombinant DNA

A seed culture of *Escherichia coli* NM514 strain was in usual manner infected with the phage in Example 3-4, and the infected cells were inoculated in an agar plate (pH 7.0) containing 10 g/l bacto-tryptone, 5 g/l bacto-yeast extract, 10 g/l sodium chloride and 15 g/l bacto-agar, and incubated at 37°C for 16 hours to form plaques. The agar plate was covered with a

nylon film and allowed to stand for about 30 seconds to attach the plaques thereunto. The nylon film was detached from the plate, and successively soaked in an aqueous solution containing 0.5 M sodium hydroxide and 1.5 M sodium chloride for 7 min and in 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 1.5 M sodium chloride for 3 min. The nylon film was washed with 2xSSC, air-dried, soaked in 0.4 N sodium hydroxide for 20 min, washed with 5xSSC, air-dried, soaked in a solution containing 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA, and incubated at 65°C for 3 hours. Thereafter, the resultant nylon film was incubated in a solution containing an adequate amount of DNA fragment as the probe 2 obtained in Example 3-2 and labeled with ³²P by "READY PRIME DNA LABELLING SYSTEM", a DNA labeling kit commercialized by Amersham Corp., Div., Amersham International, Arlington Heights, USA, 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 µg/ml of denatured salmon sperm DNA, and the mixture was incubated at 60°C for 20 hours to effect hybridization. The resultant was subjected to radioautography similarly as above to select phage DNA clones which strongly hybridized with the probe 2.

With conventional techniques, the clones were amplified in *Escherichia coli*, followed by extracting a recombinant DNA from the cells. The recombinant DNA was cleaved with *Eco* RI, a restriction enzyme. Plasmid vector pUC19 (ATCC 37254) was cleaved with the same restriction enzyme, and the resultant cleaved DNA fragments and plasmid fragments were ligated with DNA ligase to obtain a recombinant DNA which was then introduced into *Escherichia coli* JM109 strain (ATCC 53323) by conventional

competent cell method to obtain a transformant.

Example 3-6

Determination of base sequence of DNA and amino acid sequence of protein

The transformant in Example 3-5 was inoculated into L-broth (pH 7.2) and cultured at 37°C for 18 hours under shaking conditions. The resultant proliferated cells were collected and treated with conventional alkali-SDS method to obtain a recombinant DNA containing the DNA according to the present invention. The analysis on an automatic sequencer using a fluorophotometer revealed that the recombinant DNA contains the base sequence from the 5'-terminus in SEQ ID NO:3. The decoding of the base sequence indicated that it encodes the amino acid sequence containing the N-terminus in SEQ ID NO:3. The amino acid sequence contains the partial amino acid sequences in SEQ ID NOs:4 and 5 corresponding to those positioning from 79 to 103 and from 26 to 43 in SEQ ID NO:3, and this means that the present polypeptide contains the amino acid sequence containing the N-terminus in SEQ ID NO:3, and that it is encoded by a DNA containing the base sequence from the 5'-terminus in SEQ ID NO:3 where the symbol "Xaa" means "methionine" or "threonine".

In the following Examples 4 to 7, a cDNA, which encodes another polypeptide that induces the IFN- γ production by immunocompetent cells, is prepared from human liver mRNA by using as a probe a DNA fragment of the base sequence in SEQ ID NO:3. The cDNA was analyzed for base sequence and decoded to determine the amino acid sequence of the polypeptide. The cDNA was allowed to express in *Escherichia coli*, followed by studying the feature and property of the formed polypeptide.

Example 4

Base sequence of DNA encoding polypeptide and
amino acid sequence of polypeptide

Example 4-1

Preparation of cDNA library

cDNA library was prepared from a human liver RNA supplemented with "POLY A", a product commercialized by Clontech-BIOSOFT, Paris Cedex, France, by using "cDNA SYNTHESIZING SYSTEM PLUS", a cDNA cloning kit commercialized by Amersham Corp., Div., Amersham International, Arlington Heights, USA. The procedures were as follows: To 1.5-ml reaction tube were successively added 10 µl of a solution for synthesizing the first strand cDNA, 2.5 µl of one mM sodium pyrophosphate, 2.5 µl of a solution containing one µg/l of a human placenta ribonuclease inhibitor, 5 µl of a solution containing one µg/l of a deoxynucleotide triphosphate mix, 2.5 µl of a solution containing one µg/l oligo-dT primer, 5 µl of a human liver RNA supplemented with poly(A), and volumed up to 45 µl with sterilized distilled water. Thereafter, the resultant mixture was mixed with 5 µl of a solution containing a reverse transcriptase, and incubated at 42°C for 40 min to obtain a reaction mixture containing the first strand cDNA.

To the reaction mixture was added 93.5 µl of a solution for synthesizing the second strand cDNA, 4 units of ribonuclease H derived from *Escherichia coli*, 115 units of DNA polymerase, and volumed up to 250 µl with sterilized distilled water. The resultant mixture was successively incubated at 12°C for 60 min, at 22°C for 60 min, and at 70°C for 10 min, mixed with 10 units of T4 polymerase, and further incubated at 37°C for 10 min. To

the reaction mixture was added 10 μ l of 0.25 M EDTA (pH 8.0) to suspend the reaction, and the resultant mixture was in usual manner extracted with phenol and chloroform, and treated with ethanol to precipitate the objective second strand cDNA, followed by recovering the precipitate.

To the second strand cDNA thus obtained were added 2 μ l L/K buffer (pH 8.0), 250 pmole *Eco* RI adaptor, and 2.5 units of T4 DNA ligase, and the resultant solution was volumed up to 20 μ l with sterilized distilled water, and incubated at 15°C for 16 hours to ligate the *Eco* RI adaptor to the both ends of the cDNA. The resultant mixture was then mixed with 2 μ l of 0.25 M EDTA to suspend the reaction, and subjected to molecular sieve chromatography to remove intact *Eco* RI adaptor. To the resultant were added 40 μ l of L/K buffer (pH 8.0) and 80 units of T4 polynucleotide kinase, and the mixture was volumed up to 400 μ l with sterilized distilled water, followed by the incubation at 37°C for 30 min to methylate the *Eco* RI cleavage sites. The resultant mixture was extracted with phenol and chloroform and treated with ethanol to precipitate the objective cDNA, followed by recovering the cDNA. To the cDNA were added 1.5 μ l of L/K buffer (pH 8.0) containing an adequate amount of λ gt 10 arms, and 2.5 units of T4 DNA ligase, and the resultant solution was volumed up to 15 μ l with sterilized distilled water, incubated at 15°C for 16 hours to effect ligation, and subjected to conventional *in vitro* packaging method to obtain a phage containing a recombinant λ DNA.

Example 4-2

Cloning of recombinant DNA

A seed culture of *Escherichia coli* NM514 strain was in usual manner infected with the phage in Example 4-1, and the infected cells were inoculated in an agar plate (pH 7.0) containing 10 g/l bacto-trypton, 5 g/l bacto-yeast extract, 10 g/l sodium chloride, and 15 g/l bacto-agar, and incubated at 37°C for 16 hours to form plaques. According to conventional method, the agar plate was covered with a nylon film and allowed to stand for about 30 seconds to attach the plaques thereunto. Thereafter, the nylon film was detached from the plate, and successively soaked in an aqueous solution containing 0.5 N sodium hydroxide and 1.5 M sodium chloride for 7 min and in 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 1.5 M sodium chloride for 3 min. The nylon film was washed with 2xSSC, air-dried, soaked in 0.4 N sodium hydroxide for 20 min, washed with 5xSSC, air-dried, soaked in a solution containing 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS and denatured salmon sperm DNA, and incubated at 65°C for 3 hours. To clone the objective recombinant DNA, a DNA fragment having the base sequence in SEQ ID NO:3 was labeled with ³²P by "READY PRIME DNA LABELLING SYSTEM", a DNA labeling kit commercialized by Amersham Corp., Div., Amersham International, Arlington Heights, USA, to obtain probe 3. The procedures were as follows: Place in 1.5-ml reaction tube 25 ng of a DNA fragment prepared by the method in Example 3-5, volumed up to 45 µl of sterilized distilled water, incubated at 95°C for 3 min, and transferred to another reaction tube. Five µl of [α -³²P]dCTP solution was added to the reaction tube, and labeled by incubating it at 37°C for 30 min. Thereafter, the resultant product containing the labeled DNA fragment was subjected to conventional molecular sieve chromatography to remove intact [α -³²P].

The above nylon film was soaked in a mixture solution containing 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 µg/ml of a denatured salmon sperm DNA, and the mixture was incubated at 60°C for 20 hours to effect hybridization, and further incubated at ambient temperature in 6xSSC for 20 min and in 2xSSC for 20 min. The resultant was washed and subjected to autoradiography similarly as above to select phage DNA clones which strongly hybridized with the probe 3.

With conventional techniques, the DNA clones were amplified in *Escherichia coli*, followed by the extraction of a recombinant DNA from the cells. The recombinant DNA was cleaved with *Eco* RI, a restriction enzyme. Plasmid vector pUC19 (ATCC 37254) was cleaved with the same restriction enzyme, and the cleaved DNA fragments and plasmid fragments were ligated with DNA ligase to obtain a recombinant DNA which was then introduced into *Escherichia coli* JM109 strain (ATCC 53323) by conventional competent cell method to obtain a transformant containing the present DNA.

Example 4-3

Determination of base sequence and amino acid sequence

The transformant in Example 4-2 was inoculated into L-broth (pH 7.2) containing 50 µg/ml of ampicillin, and cultured at 37°C for 18 hours under shaking conditions. The proliferated cells were collected by centrifugation and treated with conventional alkali-SDS method to extract a recombinant DNA. The analysis of the base sequence on an automatic sequencer using a fluorophotometer revealed that the recombinant DNA contains the base sequence in SEQ ID NO:6. The amino acid sequence estimable

from the base sequence is also shown in SEQ ID NO:6, and this indicates that the present polypeptide has an amino acid sequence, for example, the one in SEQ ID NO:1, and that the polypeptide is encoded by the DNA of the base sequence in SEQ ID NO:2. In SEQ ID NO:6, the amino acid as shown by "Xaa" means "isoleucine" or "threonine".

Example 5

Preparation of replicable recombinant DNA and transformant

To a 0.5-ml reaction tube were added 8 μ l of 25 mM magnesium chloride, 10 μ l of 10xPCR buffer, 8 μ l of one mM dNTP mix, 0.5 μ l of a solution containing 2.5 units/ μ l AmpliTaq DNA polymerase, and one ng of the recombinant DNA in Example 4-2. The resultant mixture was mixed with adequate amounts of 2 oligonucleotides, as a sequence primer or anti-sense primer, having base sequences represented by 5'-CGAGGCATCCTACTTTGGCAAGCTTG-3' and 5'-CAAGGAATTCCTAGTCTTCGTTTTG-3' which had been chemically synthesized based on the base sequences near to the N- and C-termini in SEQ ID NO:1, and volumed up to 100 μ l with sterilized distilled water. The resultant mixture was in usual manner successively incubated at 94°C for one min, at 60°C for 2 min, and at 72°C for 3 min, and this incubation cycle was repeated for 40 times to obtain a PCR product which was then cleaved with *Bam* HI and *Eco* RI as restriction enzymes to obtain a *Bam* HI-*Eco* RI DNA fragment. The resultant *Bam* HI-*Eco* RI DNA fragment was mixed with an adequate amount of sterilized distilled water. The solution was mixed with 10 ng "pGEX-2T", a plasmid vector commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, which had been previously cleaved with *Bam* HI and *Eco* RI as a restriction enzyme,

10 µl of 10xligation buffer, and an adequate amount of 10 mM ATP to give a final concentration of one mM, followed by the incubation at 16°C for 18 hours to obtain the replicable recombinant DNA pHIGIF.

The recombinant DNA pHIGIF was introduced into *Escherichia coli* DH5α strain commercialized by Toyobo Co., Ltd., Tokyo, Japan, and the resultant transformant "HIGIF" was inoculated into L-broth (pH 7.2) containing 50 µg/ml ampicillin, and incubated at 37°C for 18 hours under shaking conditions. The resultant culture was centrifuged to obtain the proliferated transformants which were then subjected to conventional alkali-SDS method to extract the recombinant DNA pHIGIF. The analysis of the recombinant pHIGIF on the dideoxy method revealed that as shown in FIG.2 "HIGIF cDNA" or the cDNA in SEQ ID NO:2 ligated to the sites in the downstream of genes for Tac promotor and glutathione S-transferase.

Example 6

Production of polypeptide from transformant

The transformant HIGIF in Example 5 was inoculated into T-broth (pH 7.2) containing 50 µg/ml of ampicillin, and incubated at 37°C for 18 hours under shaking conditions to obtain a seed culture. Eighteen L aliquots of a fresh preparation of T-broth (pH 7.2) were placed in 30-L jar fermenters, inoculated with one v/v % of the seed culture, and cultured at 37°C under aeration-agitation conditions. During the cultivation, the culture was sampled and monitored for absorbance at a wave length of 650 nm, and, when the absorbance reached to about 1.5, IPTG was added to the culture up to give 0.1 mM. Thereafter, the culture was further incubated for another 5 hours and centrifuged to separate

cells from the culture. The cells were suspended in a mixture solution (pH 7.2) containing 139 mM sodium chloride, 7 mM disodium hydrogen phosphate, and 3 mM sodium dihydrogen phosphate, treated in usual manner with ultrasonic, and centrifuged to obtain a supernatant.

The supernatant was fed to a column packed with "GLUTATHIONE SEPHAROSE 4B", a product of Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, which had been previously equilibrated with a mixture solution (pH 7.2) containing 139 mM sodium chloride, 7 mM disodium hydrogen phosphate and 3 mM sodium dihydrogen phosphate. The column was washed with a fresh preparation of the same mixture solution, and 100 U of thrombin was added to one ml of the gel in the column to effect enzymatic cleavage reaction while allowing the column to stand at ambient temperature for 16 hours. The column was fed with a fresh preparation of the same mixture solution to elute the reaction product, and the eluate was fed to a column packed with "SUPERDEX 75", a product of Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, followed by collecting fractions corresponding near to 18,500 daltons. The fractions were pooled, concentrated and lyophilized to obtain a solid product containing the present polypeptide in a yield of about 80 µg per one ml of the culture.

Example 7

Physicochemical property of polypeptide

Example 7-1

Molecular weight

In accordance with the method reported by U. K. Laemmli in *Nature*, Vol.227, pp.680-685 (1970), the purified polypeptide prepared by the method in Example 6 was electrophoresed in a

sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel free of reducing agent to mainly show a single protein band with an IFN- γ inducibility at a position corresponding to about $18,500 \pm 3,000$ daltons. The marker proteins used in this experiment were calf serum albumin (MW=67,000 daltons), ovalbumin (MW=45,000 daltons), soy bean trypsin inhibitor (MW=20,100 daltons), and α -lactalbumin (MW=14,400 daltons).

Experiment 7-2

Isoelectric point

The purified polypeptide in Example 6 was chromatofocused to show an isoelectric point of about 4.9 ± 1.0 .

Example 7-3

Amino acid sequence containing the N-terminus

The purified polypeptide in Example 6 was analyzed on "MODEL 473 A", a protein sequencer commercialized by Perkin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA, and revealed that it has the structure wherein a peptide, "Gly-Ser-", coupled to the tyrosine residue in the N-terminal amino acid sequence in SEQ ID NO:7 by the addition of glutathione S-transferase and by the cleavage with thrombin.

Example 7-4

Biological activity

From female C3H/HeJ mice, 8-week-old, were extracted their spleens which were then suspended in serum-free RPMI 1640 medium (pH 7.4), and the resultant cells were washed with a fresh preparation of the same medium, and soaked in Gey solution (pH 8.0) to effect hemolysis. The resultant spleen cells were suspended in RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v & calf serum to give a cell density of 1×10^7 cells/ml. Ten ml

aliquots of the cell suspension were distributed into plastic petri dishes, 9 cm in diameter, and incubated at 37°C for one hour in a 5 v/v % CO₂ incubator. Only cells floating in the resultant cultures were collected and washed with RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % calf serum for use in the following test for IFN- γ induction.

Mouse spleen cells were suspended in RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % calf serum to give a cell density of 1×10^7 cells/ml, and 0.15 ml aliquots of which were injected into 96-well microplates, followed by adding to each well 0.05 ml of a solution of a purified polypeptide diluted with a fresh preparation of the same medium, and incubating the cells with or without the addition of 0.05 ml of 2.5 μ g/ml of concanavalin A or 50 units/ml of interleukin 2, and incubating the resultant at 37°C for 24 hours in a 5 v/v % CO₂ incubator. After completion of the culture, the resultant supernatant in each well was sampled by 0.1 ml to assay the activity of the formed IFN- γ with enzyme immunoassay. As a control, a system similar to the above system was provided and similarly treated as above except for not using the purified polypeptide, concanavalin A and interleukin 2. As an IFN- γ standard, a mouse IFN- γ preparation Gg02-901-533, obtained from the National Institutes of Health, USA, was used and the activity was expressed with international units (IU). The results were in Table 1.

Table 1

Sample concentration ($\mu\text{g/ml}$)	IFN- γ production by mouse spleen cell (IU/ml)		
	Sample	Sample plus concanavalin A	Sample plus interleukin 2
10.00	12	138	118
3.33	6	88	55
1.11	5	56	16
0.37	5	21	12
0.12	5	12	10
0.04	5	11	7
0	0	4	1

Note : In the Table "Sample" means the present polypeptide.

Example 7-4(b)

Induction of IFN- γ production from human lymphocyte

By using a syringe containing heparin, a healthy donor was collected blood which was then diluted by 2-fold with serum-free RPMI 1640 medium (pH 7.4), and overlaid on ficoll. The resultant was centrifuged at 2,000 rpm for 20 min to obtain lymphocytes which were then washed with RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % calf serum, suspended in a fresh preparation of the same medium to give a cell density of 5×10^6 cells/ml, and treated similarly as in Example 7-4(a) except that a human IFN- γ standard, Gg23-901-530, obtained from the National Institutes of Health, USA, was used as an IFN- γ standard. The results were in Table 2.

Table 2

Sample concentration ($\mu\text{g/ml}$)	IFN- γ production by human lymphocyte (IU/ml)		
	Sample	Sample plus concanavalin A	Sample plus interleukin 2
10.00	191	479	1,182
3.33	169	576	1,419
1.11	168	426	1,106
0.37	150	296	739
0.12	74	193	390
0.04	36	137	324
0	1	11	24

Note : In the Table "Sample" means the present polypeptide.

The results in Tables 1 and 2 evidence that the present polypeptide has an activity of inducing IFN- γ production by immunocompetent cells of mammals including human and mouse. In the control groups, any significant IFN- γ production was not found, while in the systems with the polypeptide a significant IFN- γ production was observed. This activity of the polypeptide is strongly augmented when used in combination with concanavalin A or interleukin 2.

[Effect of the Invention]

The present invention is based on the finding of a novel polypeptide which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. The polypeptide is a substance which has a partially or totally revealed amino acid sequence, and a stable activity of inducing IFN- γ production by immunocompetent cells. Therefore, the present polypeptide is widely used as an IFN- γ inducer for the IFN- γ production by the cell culture method and as a therapeutic and/or prophylactic agent in general for IFN- γ susceptible diseases such as viral diseases, malignant tumors, and immunopathies.

The present polypeptide has a strong IFN- γ inducibility

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 471 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

```

TACTTTGGCA AGCTTGAATC TAAATTATCA GTCATAAGAA ATTTGAATGA CCAAGTTCTC   60
TTCATTGACC AAGGAAATCG GCCTCTATTT GAAGATATGA CTGATTCTGA CTGTAGAGAT  120
AATGCACCCC GGACCATATT TATTATAAGT ATGTATAAAG ATAGCCAGCC TAGAGGTATG  180
GCTGTAACTA TCTCTGTGAA GTGTGAGAAA ATTTCAAYTC TCTCCTGTGA GAACAAAATT  240
ATTTCTTTTA AGGAAATGAA TCCTCCTGAT AACATCAAGG ATACAAAAAG TGACATCATA  300
TTCTTTTCACA GAAGTGTCCC AGGACATGAT AATAAGATGC AATTTGAATC TTCATCATAC  360
GAAGGATACT TTCTAGCTTG TGAAAAAGAG AGAGACCTTT TTAAACTCAT TTTGAAAAAA  420
GAGGATGAAT TGGGGGATAG ATCTATAATG TTCACTGTTC AAAACGAAGA C           471

```

(3) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 471 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: double

(D) TOPOLGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

(iii) HYPOTHETICAL: No

(iv) ANTI-SENSE: No

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: mouse

(F) TISSUE TYPE: liver

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: 1-471 mat peptide

(C) IDENTIFICATION METHOD: S

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

```

AAC TTT GGC CGA CTT CAC TGT ACA ACC GCA GTA ATA CGG AAT ATA AAT   48
Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
1      5      10      15
GAC CAA GTT CTC TTC GTT GAC AAA AGA CAG CCT GTG TTC GAG GAT ATG   96
Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
      20      25      30
ACT GAT ATT GAT CAA AGT GCC AGT GAA CCC CAG ACC AGA CTG ATA ATA  144
Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
      35      40      45
TAC ATG TAC AAA GAC AGT GAA GTA AGA GGA CTG GCT GTG ACC CTC TCT  192
Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
      50      55      60
GTG AAG GAT AGT AAA AYG TCT ACC CTC TCC TGT AAG AAC AAG ATC ATT  240
Val Lys Asp Ser Lys Zaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
      65      70      75      80
TCC TTT GAG GAA ATG GAT CCA CCT GAA AAT ATT GAT GAT ATA CAA AGT  288
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
      85      90      95
GAT CTC ATA TTC TTT CAG AAA CGT GTT CCA GGA CAC AAC AAG ATG GAG  336

```

Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu	
			100					105					110			
TTT	GAA	TCT	TCA	CTG	TAT	GAA	GGA	CAC	TTT	CTT	GCT	TGC	CAA	AAG	GAA	384
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu	
		115					120					125				
GAT	GAT	GCT	TTC	AAA	CTC	ATT	CTG	AAA	AAA	AAG	GAT	GAA	AAT	GGG	GAT	432
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp	
	130					135					140					
AAA	TCT	GTA	ATG	TTC	ACT	CTC	ACT	AAC	TTA	CAT	CAA	AGT				471
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser				
145					150					155						

(4) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 25 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (v) FRAGMENT TYPE: internal fragment
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

Ile	Ile	Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	
1				5				10						15		
Gln	Ser	Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys								
			20					25								

(5) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 18 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (v) FRAGMENT TYPE: internal fragment
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu	
1				5				10						15		
Pro	Gln															

(6) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 1120 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: double
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA
- (iii) HYPOTHETICAL: No
- (iv) ANTI-SENSE: No
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: human

(F)TISUE TYPE:liver
 (ix)FEATURE:
 (A1)NAME/KEY:1-177 5'-UTR
 (C1)IDENTIFICATION METHOD:S
 (A2)NAME/KEY:178-285 leader peptide
 (C2)IDENTIFICATION METHOD:S
 (A3)NAME/KEY:286-756 mat peptide
 (C3)IDENTIFICATION METHOD:S
 (A4)NAME/KEY:757-1120 3'-UTR
 (C4)IDENTIFICATION METHOD:S
 (xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:6:

```

GCCTGGACAG TCAGCAAGGA ATTGTCTCCC AGTGCATTTT GCCCTCCTGG CTGCCAACTC 60
TGGCTGCTAA AGCGGCTGCC ACCTGCTGCA GTCTACACAG CTTCGGGAAG AGGAAAGGAA 120
CCTCAGACCT TCCAGATCGC TTCCTCTCGC AACAAACTAT TTGTCGCAGG AATAAAG 177
ATG GCT GCT GAA CCA GTA GAA GAC AAT TGC ATC AAC TTT GTG GCA ATG 225
Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met
1 5 10 15
AAA TTT ATT GAC AAT ACG CTT TAC TTT ATA GCT GAA GAT GAT GAA AAC 273
Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn
20 25 30
CTG GAA TCA GAT TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA 321
Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile
35 40 45
ACA AAT TTG AAT GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT 369
Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro
50 55 60
CTA TTT GAA GAT ATG ACT GAT TCT GAC TGT AGA GAT AAT GCA CCC CGG 417
Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg
65 70 75 80
ACC ATA TTT ATT ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG 465
Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met
85 90 95
GCT GTA ACT ATC TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA AYT CTC TCC TGT 513
Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys
100 105 110
GAG AAC AAA ATT ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC 561
Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile
115 120 125
AAG GAT ACA AAA AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA 609
Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly
130 135 140
CAT CAT AAT AAG ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT 657
His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe
145 150 155 160
CTA GCT TGT GAA AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA 705
Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys
165 170 175
GAG GAT GAA TTG GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA 753
Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu
180 185 190
GAC TAGCTA TTAATAATTC ATGCCGGGCG CAGTGGCTCA CGCCTGTAAT CCCAGCCCTT 812
Asp
TGGGAGGCTG AGGCGGGCAG ATCACCAGAG GTCAGGTGTT CAAGACCAGC CTGACCAACA 872
TGGTGAAACC TCATCTCTAC TAAAAATACT AAAAATTAGC TGAGTGTAGT GACGCATGCC 932
CTCAATCCCA GCTACTCAAG AGGCTGAGGC AGGAGAATCA CTTGCACTCC GGAGGTAGAG 992
GTTGTGGTGA GCGGAGATTG CACCATTGCC CTCTAGCCTG GGCAACAACA GCAAACTCC 1052

```

ATCTCAAAAA ATAAAATAAA TAAATAAACA AATAAAAAAT TCATAATGTG AAAAAA AAAA 1112
AAAAAAA 1120

(7) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 10 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal fragment

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser
1 5 10

[Brief Description of the Accompanying Drawings]

FIG.1 is an HPLC elution pattern of a peptide fragment obtained by trypsinizing a protein derived from mouse liver.

FIG.2 is a figure of the structure of the present recombinant DNA pHIG1F.

[Explanation of the Symbols]

HIG1F cDNA : cDNA which encodes the present polypeptide

Ptac : tac promoter

GST : glutathione S transferase gene

AmpR : ampicillin resistant gene

ori : replication initiation site of *Escherichia coli*

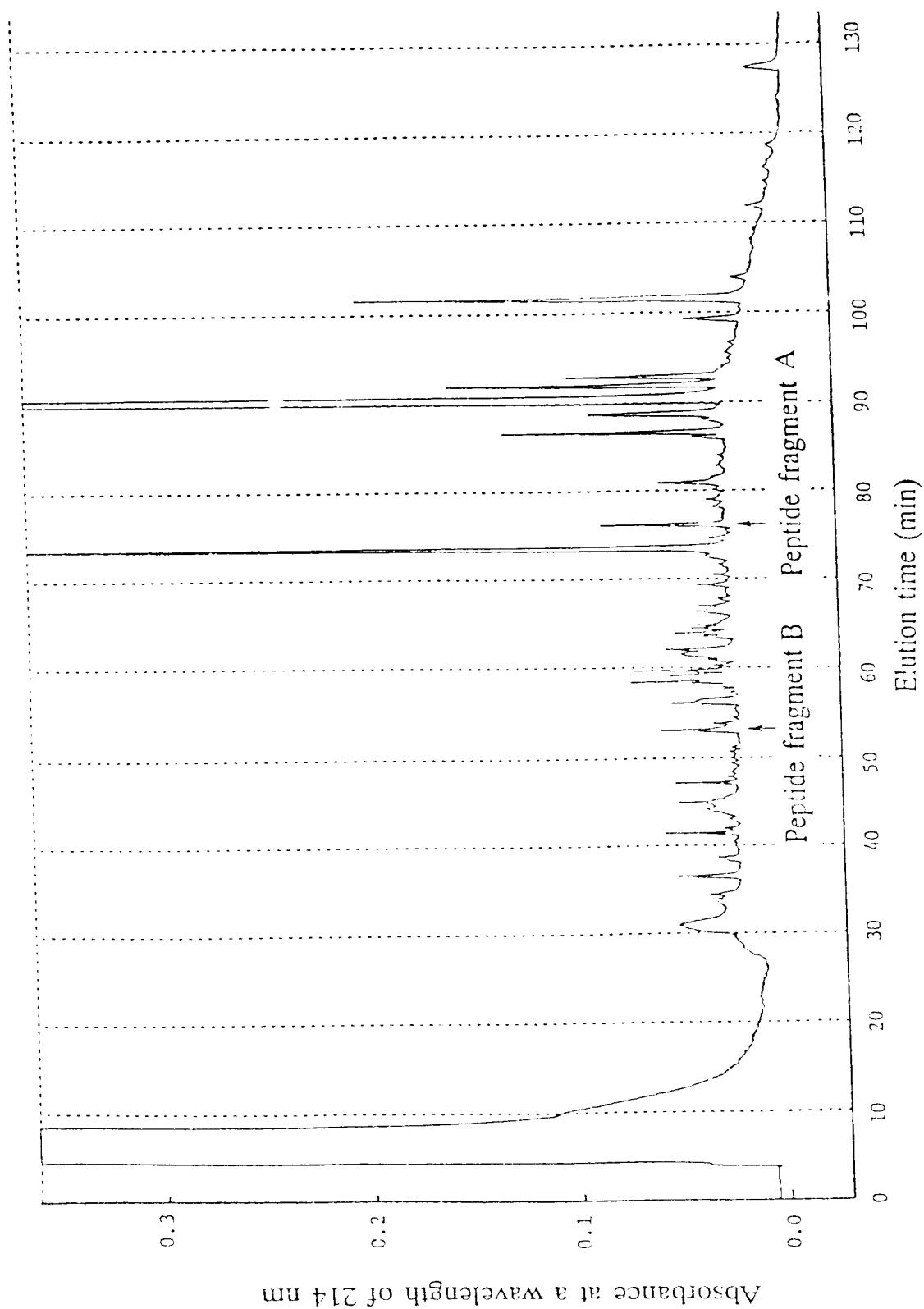


FIG.1

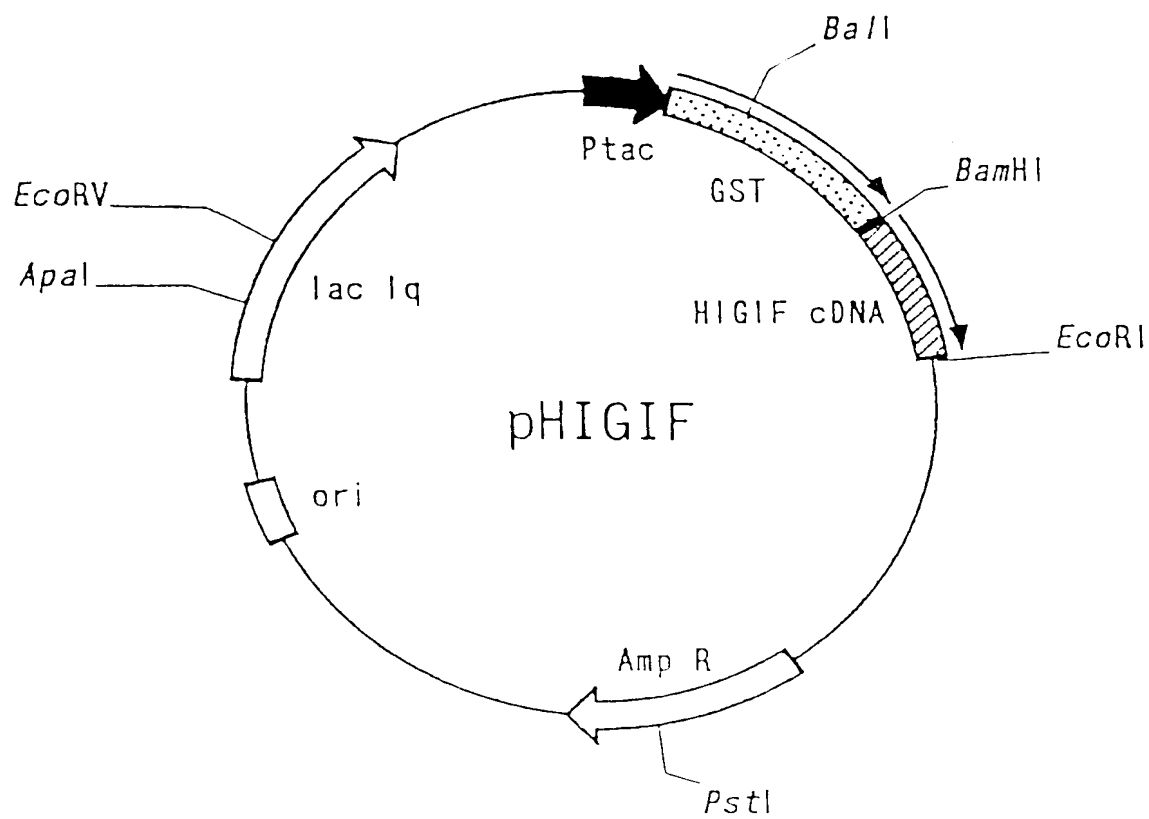


FIG.2

[Document name] Abstract

[Summary]

[Object] The present invention provides a polypeptide which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells, a DNA encoding the polypeptide, a recombinant DNA containing the DNA, a transformant containing the recombinant DNA, and a process for preparing the polypeptide by using the transformant.

[Construction] The present invention is constructed by a polypeptide with specific amino acid sequence, a DNA encoding the polypeptide, a replicable recombinant DNA containing the DNA and a self-replicable vector, a transformant prepared by introducing the recombinant DNA into an appropriate host, and a process for preparing the polypeptide comprising culturing the transformant in a nutrient culture medium to form the polypeptide, and recovering the formed polypeptide from the resultant culture.

[Selected Figure] FIG.2